

Liposomale Formulierungen von Hypericin zur Anwendung in der photodynamischen Therapie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nikola Plenagl

aus **Mainburg**

Marburg/Lahn **2019**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Udo Bakowsky**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Frank Runkel**

Eingereicht am **05.12.2018**

Tag der mündlichen Prüfung am **22.01.2019**

Hochschulkennziffer: 1180

Die vorliegende Arbeit entstand
auf Anregung und unter Leitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Philipps-Universität Marburg

Für meine Eltern
In Liebe und Dankbarkeit

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen der Photodynamischen Therapie	1
1.2	Photodynamische Therapie von Tumoren	3
1.2.1	Wirkung der photodynamischen Therapie auf Tumorzellen	3
1.2.2	Photosensitizer	4
1.3	Antibakterielle photodynamische Therapie	5
1.3.1	Wirkmechanismus.....	5
1.3.2	Aufnahme der Photosensitizer in grampositive und gramnegative Bakterien....	6
1.3.3	Inaktivierung von Biofilmen	8
1.3.4	Anwendung der photodynamischen antimikrobiellen Chemotherapie	9
1.4	Hypericin.....	9
1.4.1	Herkunft und chemische Eigenschaften	9
1.4.2	Hypericin in der photodynamischen Therapie von Tumoren	11
1.4.3	Hypericin in der photodynamischen antimikrobiellen Chemotherapie	12
1.5	Liposomen	13
1.5.1	Definition, Aufbau und Eigenschaften	13
1.5.2	Liposomen als Arzneistoffträgersysteme	14
1.5.3	pH-sensitive Liposomen	16
1.5.4	Wirkstoff-Cyclodextrin Komplexe verkapselt in Liposomen	17
1.5.5	Tetraetherlipide.....	19
1.5.6	Hypericin-Liposomen in der photodynamischen Therapie.....	20
1.6	Aufgaben und Ziele der Arbeit	22
2	Methoden	24
2.1	Herstellung der Hypericinformulierungen	24
2.1.1	Extraktion der Tetraetherlipide.....	24
2.1.2	Einschlussverbindung von Hypericin in (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin	24

2.1.3	Hypericin-Liposomen.....	25
2.1.4	Beschichtung von Polyurethan mit dem Layer-by-Layer Verfahren.....	27
2.2	Charakterisierung der Hypericin-Liposomen.....	28
2.2.1	Dynamische Lichtstreuung.....	28
2.2.2	Laser-Doppler-Anemometrie	29
2.2.3	Raster-Kraft-Mikroskopie	29
2.2.4	Verkapselungseffizienz.....	30
2.2.5	Lagerstabilität.....	31
2.2.6	Stabilität in IMDM oder FKS 60%	31
2.3	Charakterisierung der Hypericinbeschichtungen.....	31
2.3.1	Mikroskopie.....	31
2.3.2	Gehaltsbestimmung des Hypericins.....	32
2.4	<i>In vitro</i> Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität der Liposomen	32
2.4.1	Kultivierung der Mikroorganismen	32
2.4.2	Photodynamische Therapie an Suspensionskulturen	33
2.4.3	Bindung von Hypericin an die Bakterienmembran	33
2.5	Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität im Hühnerembryomodelle	34
2.5.1	In vitro Modell.....	34
2.5.2	Versuchsablauf	35
2.6	Photodynamische Therapie von Biofilmen	36
2.6.1	Biofilm Kultivierung.....	36
2.6.2	Charakterisierung des Biofilmwachstums.....	36
2.6.3	Photodynamische Therapie von Biofilmen mit Liposomen	37
2.6.4	Photodynamische in vitro Aktivierung der Hypericinbeschichtungen in Kombination mit Ultraschall.....	38
2.6.5	Visualisierung der Biofilminaktivierung	38

2.7	<i>In vitro</i> Untersuchung der photodynamischen Aktivität auf SK-OV-3 Zellen.....	39
2.7.1	Kultivierung der Zellen	39
2.7.2	Zytotoxizität.....	39
2.7.3	Aufnahme von Hypericin in die Zellen	40
2.7.4	Charakterisierung des endozytotischen Aufnahmemechanismus.....	40
2.8	Biokompatibilität	41
2.8.1	<i>Ex-vivo</i> Hämolysen Assay	41
2.8.2	Aktivierter partieller Thromboplastinzeit	41
2.9	<i>In vitro</i> Untersuchung der photodynamischen Aktivität im Chorioallantois-Membran-Modell.....	42
2.9.1	Chorioallantois-Membran-Modell	42
2.9.2	Versuchsdurchführung	42
3	Herstellung und Charakterisierung von Hypericin-Liposomen – Ergebnisse und Diskussion.....	44
3.1	Dynamische Lichtstreuung und Laser-Doppler-Anemometrie.....	44
3.2	Raster-Kraft-Mikroskopie	47
3.3	Verkapselungseffizienz	49
3.4	Lagerstabilität	50
3.5	Stabilität in IMDM und 60% FKS.....	51
4	<i>In vitro</i> Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität der Hypericin-Liposomen – Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Photodynamische Therapie an Suspensionskulturen	55
4.1.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	55
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> DH5α	61
4.2	Bindung von Hypericin an die Bakterienmembran	63
4.2.1	Bindungsassay	63
4.2.2	CLSM Aufnahmen	65

5	Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität im Hühnerembryomodell – Ergebnisse und Diskussion.....	68
6	Photodynamische Therapie von Biofilmen – Ergebnisse und Diskussion	73
6.1	Charakterisierung der Hypericinbeschichtungen	73
6.2	Charakterisierung des Biofilm-Wachstums	74
6.3	Photodynamische Therapie von Biofilmen	75
6.4	Visualisierung der photodynamischen Inaktivierung der Biofilme	78
7	<i>In vitro</i> Untersuchung der photodynamischen Aktivität auf SK-OV-3 Zellen – Ergebnisse und Diskussion.....	80
7.1	Zytotoxizität auf Tumorzellen (SK-OV-3).....	80
7.2	Aufnahme von Hypericin in die Zellen	85
7.3	Charakterisierung des endozytotischen Aufnahmemechanismus.....	87
7.4	Hämokompatibilität.....	89
7.4.1	Hämolyse-Assay.....	89
7.4.2	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	90
8	<i>In vitro</i> Untersuchung der photodynamischen Aktivität im Chorioallantois-Membran-Modell – Ergebnisse und Diskussion	92
9	Zusammenfassung	94
10	Summary	97
11	Referenzen	100
12	Anhang	108
12.1	Abkürzungsverzeichnis	108
12.2	Materialien und Geräte	110
12.3	Publikationsliste.....	113
12.5	Danksagung	116
12.6	Erklärung.....	118

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Photodynamischen Therapie

Erstmals wurde der Begriff „photodynamische Wirkung“ 1904 von Professor Hermann von Tappeiner von der Ludwig-Maximilians-Universität in München geprägt. Sein Mitarbeiter Oscar Raab entdeckte zufällig, dass mit Acridinorange behandelte *Paramecium* nach Lichtexposition starben. Die Arbeitsgruppe um Tappeiner untersuchten daraufhin als Erste die Anwendung der photodynamischen Therapie (PDT) für die Behandlung von Tumoren [1]. Trotz vielversprechender Ergebnisse geriet die PDT wieder in den Hintergrund, was an dem großen Interesse für die Strahlentherapie gelegen haben könnte. Ein Meilenstein für die PDT als Tumorthherapie gelang in den 1970er Jahren mitunter durch die Forschung der Arbeitsgruppe um Thomas J. Dougherty über das photoaktive Hämatoporphyrin-Derivat (HPD). Die teilweise Aufreinigung der Substanz zu Photofrin und weitere Studien zu dessen Anwendung führten 1993 zur ersten Zulassung der PDT weltweit [2]. Die Canadian Health Protection Branch genehmigte die Behandlung von rezidivierenden Harnblasenkarzinom mit Photofrin vermittelter PDT. Daraufhin folgten weitere Zulassungen in vielen anderen Ländern [3].

Das Grundprinzip der photodynamischen Therapie vereinigt drei für sich genommen nicht toxische Elemente: Licht, Sauerstoff und einen sogenannten Photosensitizer (PS). Diese photoaktive Substanz wird dem Patienten systemisch oder topisch verabreicht. Anschließend erfolgt die Bestrahlung der zu behandelnden Stelle mit Licht geeigneter Wellenlänge, was in der Gegenwart von Sauerstoff die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) induziert. Diese wiederum sind für Zellen toxisch, da sie mit verschiedenen biologischen Molekülen wie Lipiden, Proteinen und DNA reagieren und zur Zerstörung dieser Zellstrukturen führen. Dabei ist es möglich, eine sehr hohe Selektivität der Therapie zu erreichen, indem sich der PS hauptsächlich im pathologischen Gewebe anreichert und das Licht in diesem definierten Bereich appliziert wird [4]. Allerdings wird die PDT nicht nur in der Onkologie, sondern auch in vielen anderen Bereichen, wie der Ophthalmologie, Dermatologie und Zahnmedizin erfolgreich eingesetzt. Ein besonders vielversprechendes Anwendungsgebiet ist die Behandlung bakterieller Infektionen [5].

Auch wenn sich die Zielstruktur bei den verschiedenen Indikationen unterscheidet, so ist der zugrundeliegende photochemische und photophysikalische Mechanismus immer gleich (Abb. 1). Absorbiert der PS ein Photon geht er von seinem Grundzustand, dem Singulett PS, in

den angeregten Singulett-Zustand über. Dabei bleibt der Spin der Elektronen antiparallel, allerdings wechselt ein Elektron auf ein Orbital mit höherem Energieniveau. Dieser Zustand ist sehr kurzlebig (einige Nanosekunden) und das Molekül kehrt entweder durch Umwandlung der Energie in Wärme (innere Konversion) oder über Abgabe eines Photons, also der Emission von Licht (Fluoreszenz), in seinen Grundzustand zurück. Da einige PS fluoreszieren, können sie zusätzlich zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden. Eine wesentliche Rolle für die PDT spielt jedoch der Vorgang des „Intersystem crossing“. Hierbei erfolgt unter Umkehr des Elektronenspins ein strahlungsloser Übergang vom angeregten Singulett-Zustand in den angeregten Triplett-Zustand. Dieser wiederum ist relativ langlebig (einige Mikrosekunden), da die Abgabe von Energie in Form von Licht (Phosphoreszenz) durch den Übergang in den Grundzustand einen verbotenen Elektronenübergang erfordert. Der Triplett-Zustand kann nun entweder durch Elektronentransfer (Typ-1-Mechanismus) oder durch Energieübertragung (Typ-2-Mechanismus) in den Grundzustand zurückkehren. Bei der Typ-1-Reaktion entstehen Radikalkationen und Radikalanionen, welche weiter mit molekularem Sauerstoff reagieren und reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}) erzeugen. Bei einer Typ-2-Reaktion wird die Energie vom PS auf molekularen Sauerstoff im Triplett-Zustand (Grundzustand) übertragen. Dieser liegt nun im angeregten Singulett-Zustand ($^1\text{O}_2^*$) vor.

Ist der PS wieder in seinen Grundzustand zurückgekehrt, kann der Zyklus von vorne beginnen. Die entstandenen ROS wiederum zerstören Tumorzellen und Bakterien.

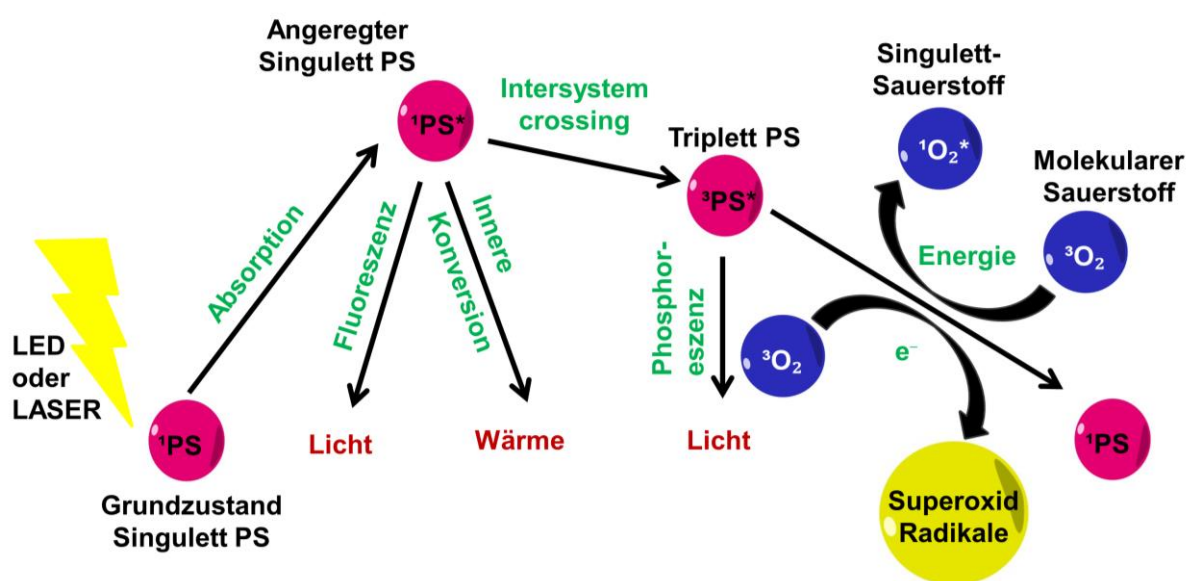


Abbildung 1: Photophysikalische und photochemische Prozesse während der photodynamischen Therapie

1.2 Photodynamische Therapie von Tumoren

1.2.1 Wirkung der photodynamischen Therapie auf Tumorzellen

Die Wirkungen der produzierten Sauerstoffspezies auf das Gewebe sind abhängig von der Art und Konzentration des verwendeten Photosensitisers, den Bestrahlungsbedingungen, der Sauerstoffkonzentration im Gewebe und dem vorliegenden Zelltyp. Da die Halbwertszeit des hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs in biologischen Systemen weniger als 40 ns beträgt und damit einen Wirkungsradius von nur ca. 20 nm besitzt, wird durch die Lokalisation des PS innerhalb der Zelle bestimmt, welches Zellkompartiment primär beschädigt wird [4]. Dies hat erheblichen Einfluss auf die Effizienz der PDT und die Art des Zelltods. Schädigungen von Strukturen wie Mitochondrien, Lysosomen, endoplasmatischem Retikulum (ER), Plasmamembran oder Nucleus können über verschiedene Signaltransduktionswege zu Apoptose, Nekrose oder Autophagozytose führen (Abb. 2) [6]. Bevor der PS nach der intravenösen Applikation in den Tumorzellen angereichert werden kann, muss er erst im intravasalen Raum verteilt werden und durch die Gefäßwände hindurch in das Tumorinterstitium gelangen. Je nach „Drug-Light Intervall“ (Abstand zwischen Applikation des PS und der Bestrahlung) befindet sich der PS noch in den Gefäßen oder er ist bereits in den interstitiellen Raum abgewandert. In Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt können also neben den Zellen auch die Tumorgefäße Zielstruktur der PDT sein. Dabei kommt es zur Zerstörung von Endothelzellen der Gefäßwand sowie zu rheologischen Veränderungen wie der Erhöhung des Viskositätswiderstands oder des intravasalen Drucks. Die Folgen sind Thrombosen durch Aktivierung der Thrombozytenaggregation, eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, Blutungen, Gefäßkonstriktion oder eine Blutstase. Durch den Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen kann es daher zur Nekrose des Tumorgewebes kommen [7]. Des Weiteren ist PDT der Auslöser für eine lokale Entzündungsreaktion, die eine antitumorale Immunantwort nach sich zieht. PDT führt zur direkten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen, darunter Interleukine (IL) wie IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 und dem Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α). Es folgt die Einwanderung von Immunzellen wie Neutrophilen, Mastzellen und Makrophagen. Außerdem werden Tumorantigene und sogenannte „damage associated molecular patterns“ (DAMP's) ausgeschüttet. Diese wirken als Immunstimulatoren, sobald sie an der Oberfläche der geschädigten Zellen exprimiert oder freigesetzt werden, und aktivieren sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Die antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen (DC) werden aktiviert und

wandern zu den lokalen Lymphknoten. Dort führen sie zur Aktivierung von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen. Dadurch erreicht die Immunantwort nicht nur die bestrahlte Läsion, sondern auch Metastasen des Tumors [8]. Diese drei Wirkmechanismen der PDT, die direkte Zytotoxizität, der thromboembolische Effekt und die Immunantwort bedingen sich dabei gegenseitig.



Abbildung 2: Die verschiedenen Wirkungen der PDT auf Tumorzellen

1.2.2 Photosensitizer

Nebenwirkungen der PDT können eine länger andauernde Photosensitivität der Haut und die Schädigung gesunden Gewebes sein. Um diese zu minimieren, ist die Wahl eines geeigneten PS entscheidend. Dieser sollte eine reine chemische Verbindung darstellen, die photostabil ist und eine geringe Zytotoxizität ohne Bestrahlung (Dark-Toxizität) aufweist. Mit Hinblick auf die Photosensitivität der Haut ist eine kurze Verweildauer der Substanz im Organismus von Vorteil. Außerdem sollte die maximale Absorption des PS möglichst im Wellenlängenbereich des therapeutischen Fensters liegen. Unterhalb von 630 nm hindern im Gewebe vorliegende Chromophore wie Hämoglobin und Melanin die Absorption des Lichts durch den PS, während über 1300 nm Wasser zusätzlich absorbiert. Bei einer Wellenlänge von 630 nm beträgt die Eindringtiefe von Licht ins Gewebe 1-3 mm und nimmt mit der Wellenlänge zu. Allerdings ist

Licht über 850 nm zu energiearm, um eine photochemische Reaktion auszulösen. Somit liegt das therapeutische Fenster in einem Bereich von 630 – 850 nm.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist eine ausreichend große Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute. Diese sollte bei ca. 0,5 liegen, was bedeutet, dass 50% der absorbierten Photonen zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen. Außerdem ist die Tumorselektivität des PS von großer Bedeutung, um die Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe zu minimieren. PS zeigen *in vivo* eine präferenzielle Akkumulation im Tumorgewebe [9]. Das Verhältnis von PS im Tumor-/Normalgewebe wird ausgedrückt als Akkumulationsindex und liegt für die meisten PS im Bereich von 2:1 bis 5:1 [10]. Um dieses Verhalten der PS zu erklären, gibt es verschiedene Theorien, welche alle auf den physiologischen Unterschieden von normalem zu Tumorgewebe gründen. Zum einen ist die Gefäßpermeabilität in Tumorgeweben erhöht und vor allem PS, die an Plasmaproteine wie Albumin binden, werden dadurch verstärkt aufgenommen. Des Weiteren exprimieren schnellwachsende Tumorzellen vermehrt LDL-Rezeptoren. So könnten an LDL gebundene PS primär von Tumorzellen endozytiert werden. Zusätzlich ist der Lymphfluss in Tumoren nicht sehr stark und der pH-Wert ist relativ niedrig, wodurch anionische PS im Tumor neutral vorliegen. Beides führt zu einer Retention des PS im Tumorgewebe. Eine weitere Theorie ist, dass Makrophagen, die in den Tumor einwandern, bereits vermehrt PS aufgenommen haben [9].

1.3 Antibakterielle photodynamische Therapie

1.3.1 Wirkmechanismus

Obwohl die „photodynamische Wirkung“ erstmals auf Mikroorganismen nachgewiesen wurde, geriet diese Indikation wieder in den Hintergrund, da gleichzeitig das Penicillin entdeckt wurde. Die Forschung konzentrierte sich hauptsächlich auf die PDT von Tumoren und erzielte schnelle Fortschritte in diesem Bereich. Die Entstehung von Antibiotikaresistenzen und multiresistenter Keime rückte die PDT als eine mögliche Alternative zur konventionellen Antibiotikatherapie jedoch wieder in den Fokus der Wissenschaft [11]. Für die Inaktivierung von Mikroorganismen durch Applikation eines PS und Licht gibt es verschiedene wissenschaftliche Bezeichnungen. Gebräuchliche Termini sind „antimicrobial photodynamic therapy“ APDT, „photodynamic antimicrobial chemotherapy“ (PACT) und „photodynamic inactivation“ (PDI). In dieser Arbeit soll im Weiteren die Abkürzung PACT verwendet werden.

Nachdem Bakterien mit einem PS behandelt wurden, akkumuliert dieser in den Mikroorganismen. Bei Bestrahlung entstehen nun ROS wie in 1.1 beschrieben und führen über zwei verschiedene Mechanismen zur Zerstörung der Bakterien. Dabei ist die Hauptursache die Schädigung der Zytoplasma-Membran. Infolgedessen kommt es zur Inaktivierung von Enzymen und Membrantransportsystemen sowie zum Austreten von zellulären Bestandteilen. Ein zweiter Mechanismus, der jedoch eine untergeordnete Rolle spielt, ist die Schädigung der DNA [12]. Aufgrund des unselektiven Wirkmechanismus besitzt die PACT ein breites Wirkungsspektrum. Antibiotikaresistente Stämme wie beispielsweise MRSA sind genauso empfindlich gegenüber PACT wie nicht resistente *Staphylococcus aureus* [13, 14]. Jedoch gibt es einige Stämme, welche oxidativen Stress und PACT aufgrund ihrer Genetik besser abwehren können als andere. Das geschieht unter anderem durch die Expression antioxidativer Enzyme wie Superoxid-Dismutase, Katalase und Peroxidasen, die ROS zu molekularem Sauerstoff abbauen und durch die Bildung von Hitzeschockproteinen [15]. Allerdings reichen diese Abwehrmechanismen bei ausreichend hohen ROS Mengen für das Überleben der Bakterien nicht aus. Es ist unwahrscheinlich, dass Bakterien Resistenzen gegen PACT entwickeln können, da die phototoxische Wirkung unmittelbar nach der PS-Exposition erfolgt und somit nicht genug Zeit bleibt, um mit der Expression schützender Proteine zu antworten [15].

Diese schnelle und einfache Behandlung und das Ausbleiben von Resistenzentwicklung sind zwei wesentliche Vorteile gegenüber der Antibiotikatherapie. Eine Herausforderung und Chance zugleich ist die Selektivität der PACT gegenüber Bakterien, um Gewebeschäden am Patienten zu vermeiden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Behandlungsparameter kationisches Zn-(II)-Phthalocyanin Bakterien wie Methicillin-resistente *S. aureus* und dessen Wildtyp abtötete, während humane Keratinocyten und Fibroblasten nicht beschädigt wurden [16].

1.3.2 Aufnahme der Photosensitiser in grampositive und gramnegative Bakterien

In den 1990er Jahren wurde herausgefunden, dass es einen Unterschied in der Empfindlichkeit grampositiver und gramnegativer Keime gegenüber PACT gibt. Dabei sprachen grampositive Keime auf die *in vitro* Behandlung mit neutralen und anionischen PS an, während auf gramnegativen Bakterien kein Effekt festgestellt werden konnte. Der Grund dafür sind die

Unterschiede in der Zellwandstruktur der beiden Gruppen (Abb. 3). Die Zellwand grampositiver Bakterien besteht aus bis zu 100 Peptidoglykanschichten. Diese werden von Lipoteichonsäuren durchzogen, welche in der darunterliegenden Zellmembran verankert sind. Die Zellwand selbst ist relativ permeabel, sodass es für Makromoleküle wie z.B. Glycopeptide und Polysaccharide bis zu einem Molekulargewicht von 30 – 60 kDa möglich ist, frei zu diffundieren. Somit ist auch für die meisten PS die Zellmembran als Zielstruktur leicht zu erreichen. Die Zellwand gramnegativer Bakterien hingegen ist komplexer aufgebaut. Über der Zellmembran befindet sich eine meist einschichtige Peptidoglykanschicht, eingebettet in den periplasmatischen Raum, welcher nach Außen durch die äußere Membran abgegrenzt wird. Letztere ist im Gegensatz zu der aus Phospholipiden bestehenden Zellmembran asymmetrisch aufgebaut. Die innere Hälfte der Doppelschicht besteht aus Phospholipiden, während die äußere Hälfte sich aus Lipopolysacchariden (LPS) zusammensetzt. Des Weiteren enthält die äußere Membran Lipoproteine und Proteine mit Porenfunktion, sogenannte Porine, durch welche kleine hydrophile Moleküle wie Zucker, Ionen und Aminosäuren aufgenommen werden können. Somit besitzen gramnegative Bakterien nach außen hin eine Permeabilitätsbarriere mit dicht gepackten negativen Ladungen, die auch der Grund für viele Antibiotikaresistenzen ist [17].

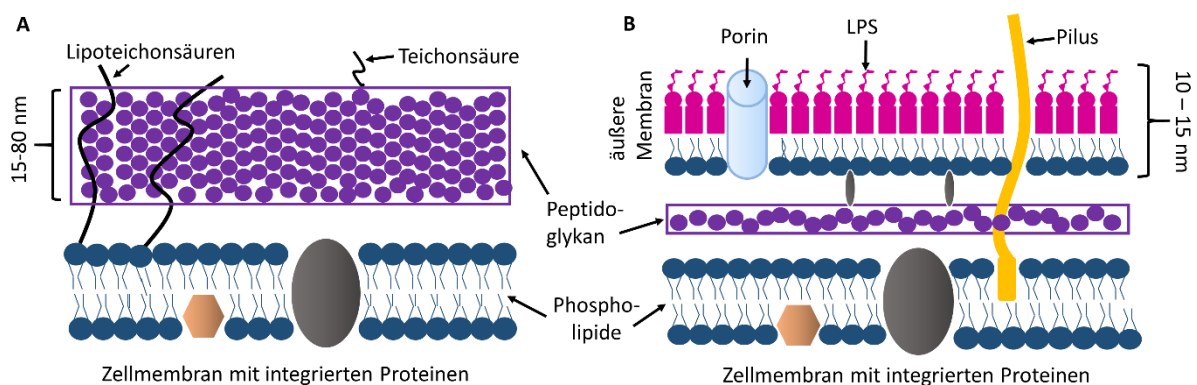


Abbildung 3: Zellwandstruktur grampositiver (A) und gramnegativer (B) Bakterien

Es wurden bereits verschiedene Ansätze entwickelt, um die PACT an gramnegativen Bakterien effektiver zu machen. Die negativ geladenen LPS besitzen eine hohe Affinität zu divalenten Kationen, wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} . Diese sorgen für die Stabilität der Membran, indem sie die Abstoßung der negativen Ladungen innerhalb dieser reduzieren. Durch Vorbehandlung mit EDTA, welches Ca^{2+} und Mg^{2+} bindet, verloren gramnegative Bakterien bis zu 50% ihrer LPS in das umliegende Medium und wurden so sensibler gegenüber hydrophoben Substanzen [18].

Auch das polykationische Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) ist in der Lage, die Integrität der äußeren Membran zu stören, und ermöglichte so die Photoinaktivierung von *E. coli* und *P. aeruginosa* mit Deuteroporphyrin [19]. Synthetische polykationische PS wie das pL-Ce6 Konjugat (Chlorin e6 gebunden an ein Polymer bestehend aus 20 Lysin Einheiten) und andere kationische PS gelangen über den „self-promoted uptake“ durch die äußere Membran. Dabei ersetzen sie divalente Kationen an ihren Bindungsstellen und stören die Membranstruktur, sodass kleine vorübergehende Risse entstehen, durch welche hydrophobe Moleküle diffundieren können [12].

1.3.3 Inaktivierung von Biofilmen

Die Ursache für bis zu 80% aller Infektionen im menschlichen Körper sind Biofilme. Diese Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen adhären an eine biologische oder nicht biologische Oberfläche und sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, welche aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) besteht. Dabei handelt es sich um Polysaccharide und Proteine die von den Bakterien selbst sezerniert werden und über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen das Biofilmm Netzwerk zusammenhalten. Die Hauptkomponente der Biofilmmatrix ist Wasser, mit einem Anteil von 97% [20]. Im Gegensatz zu freischwimmenden planktonischen Bakterien können Biofilmbakterien die Immunantwort des Wirts umgehen und nur durch Behandlung mit bis 1000-fach höheren Antibiotikakonzentrationen abgetötet werden. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die Resistenz der Biofilme. Die Matrix aus EPS dient den Bakterien als Schutzschild, um auch unter ungünstigen Bedingungen zu überleben, und ist somit auch eine Penetrationsbarriere für Chemotherapeutika. Außerdem findet man innerhalb des Biofilms sogenannte Persister, die sich aufgrund der Expression bestimmter Gene in einem „schlafenden“ Zustand befinden, währenddessen zelluläre Funktionen und somit Zielstrukturen für Antibiotika abgeschaltet sind. Bei planktonischen und Biofilm-Bakterien ist zudem ein Unterschied in der Expression von Genen, die für die DNA-Replikation, den Stoffwechsel und Bindungsproteine codieren, zu finden. Darüber hinaus sind Bakterien in der Lage, innerhalb des Biofilms über chemische Signale zu kommunizieren („Quorum sensing“) und sich ändernden Wachstumsbedingungen schnell anzupassen [15, 21].

1.3.4 Anwendung der photodynamischen antimikrobiellen Chemotherapie

Im Gegensatz zur PDT von Tumoren, bei der man den PS intratumoral oder intravenös injiziert und dieser anschließend im Tumorgewebe akkumuliert, wird bei der PACT der PS lokal auf das infizierte Areal appliziert. Dabei eignet sich die PACT besonders für die Therapie von Haut- und Weichteilinfektionen, wie zum Beispiel bei Brandwunden, einem Ulcus cruris oder nosokomialen Infektionen. Somit können systemische Infektionen verhindert und Antibiotika für kritische Indikationen aufgespart werden. Ein Vorteil gegenüber der konventionellen Antibiotikatherapie ist dabei auch, dass durch die lokale Anwendung das Mikrobiom weniger in Mitleidenschaft gezogen wird. Klinische Studien am Menschen wurden unter anderem durchgeführt für die Dekontamination von MRSA an OP-Eingriffsstellen, die Behandlung chronischer Sinusitis mit Methylenblau oder die Therapie eines Ulcus cruris mit PPA904, einem Phenothiazin Derivat. Eine weitere Studie untersuchte ALA-PPIX für die Behandlung von Akne vulgaris. Die Zahnheilkunde ist das einzige Fachgebiet für das es eine Zulassung von Methylenblau, Toluidinblau und Indocyaningrün gibt [22]. Zum Einsatz kommen diese beispielsweise zur adjuvanten Behandlung der Parodontitis. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Helicobacter pylori* auf PACT anspricht [23]. Neben der antibakteriellen Therapie sind weitere Anwendungsbereiche die Behandlung von mykobakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen, sowie Leishmaniose [24–26].

1.4 Hypericin

1.4.1 Herkunft und chemische Eigenschaften

Hypericin (4,5,7,4',5',7'-hexahydroxy-2,2'-dimethylnaphtodianthron) ist ein natürlich vorkommendes Pigment und ein Sekundärmetabolit der Gattung *Hypericum* aus der Familie der *Hypericaceae* (Abb. 4). Am weitesten verbreitet ist darunter *Hypericum perforatum*, das Johanniskraut, dessen Nutzung in der Volksmedizin schon vor mehr als 2000 Jahren beschrieben wurde. Heute wird die Pflanze in Form eines Extraktes hauptsächlich zur Behandlung leichter bis mittelschwerer depressiver Episoden oder als Johanniskrautöl gegen Entzündungen und zur Förderung der Wundheilung eingesetzt [27, 28]. Die phototoxische Wirkung von Hypericin wurde erstmals in Form des Hypericismus bei Weidetieren, die größere Mengen Johanniskraut verdaut hatten, entdeckt. Die Tiere litten unter starken Hautirritationen, erhöhter Körpertemperatur und starben in einigen Fällen an der Vergiftung

[29]. Beim Menschen konnten für Johanniskraut in einer Dosis, wie sie für die Behandlung depressiver Verstimmungen üblich ist, keine phototoxischen Nebenwirkungen festgestellt werden [30].

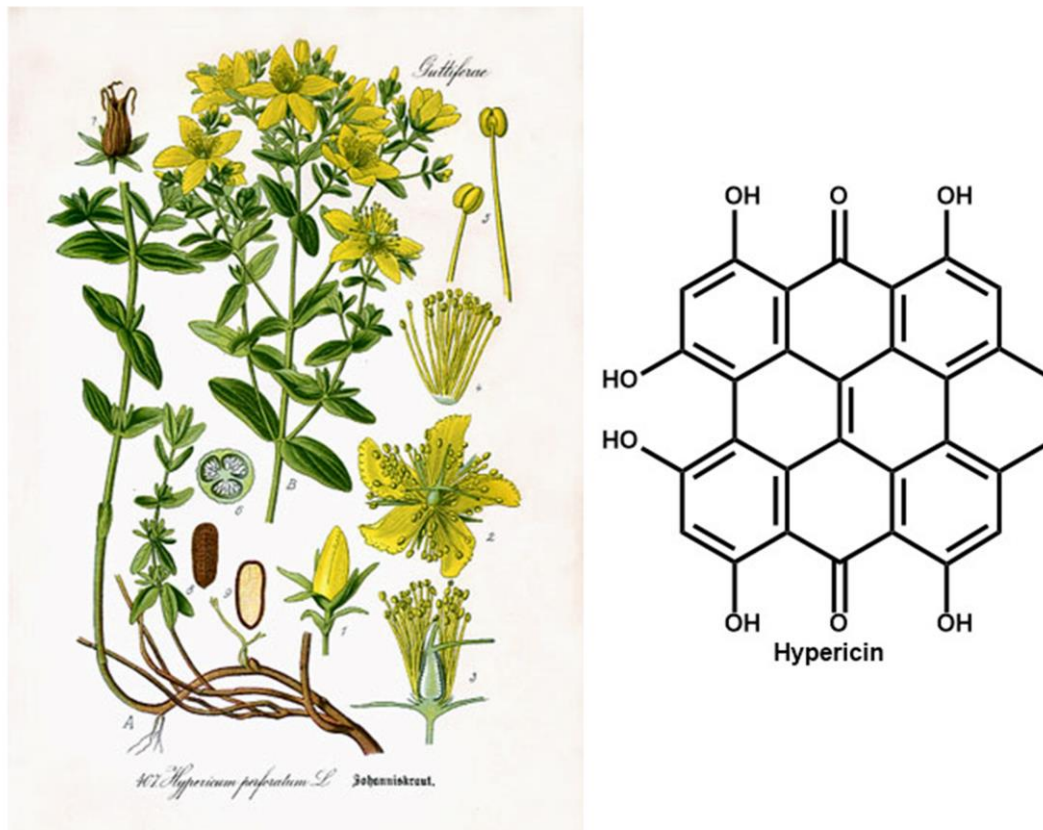


Abbildung 4: Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) und die Strukturformel von Hypericin

Hypericin wurde erstmals 1939 von Brockmann et al. isoliert [31]. 1942 publizierte der gleiche Autor die korrekte Summenformel $C_{30}H_{16}O_8$ und 8 Jahre später die richtige Strukturformel [32]. Hypericin ist sehr hydrophob und unlöslich in Wasser sowie den meisten unpolaren Lösungsmitteln. In Hypericin-Lösungen bilden sich unter Zugabe von Wasser Aggregate aus, die unlösliche Pellets formen. Dieser Prozess scheint irreversibel zu sein. Außerdem bildet Hypericin Komplexe mit biologischen Makromolekülen wie LDL oder Albumin [33]. In organischen Lösungsmitteln und in einem pH Bereich von 4-11 liegt Hypericin als Monoanion vor, da es sich wie eine vinyloge Carbonsäure verhält. Die stark lipophilen Eigenschaften machen die Verabreichung von Hypericin im klinischen Alltag schwierig. Oft wird der PS in Lösungsmitteln wie DMSO gelöst, die potentiell schädigende Effekte auf Gewebe haben. Daher ist eine geeignete wässrige Formulierung von Hypericin dringend notwendig.

Das Naphthodianthron zeigt eine Fluoreszenz mit Emissionsmaxima um 590 und 640 nm und Hauptabsorptionsbanden um 540 und 590 nm. In diesem Wellenlängenbereich ist die

Gewebepenetration von Licht, hauptsächlich auf Grund der Absorption von Hämoglobin, verringert. Daher liegt das Potential von Hypericin eher in der Behandlung oberflächlicher Läsionen [34]. Blank et al. zeigten im Mausmodell immerhin eine Tiefe der Tumornekrose von 1 cm nach Hypericin-vermittelter PDT bei 590 nm [35].

Neben der guten physiologischen Verträglichkeit, der geringen Dark-Toxizität, der raschen Elimination aus gesundem Gewebe, macht die hohe Triplet- und Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Hypericin zu einem attraktiven PS [36]. Weiterhin zeigt Hypericin eine hohe Photostabilität mit einer Fluoreszenz, die 16 h nach Instillation ins Tumorgewebe noch nachweisbar ist [37]. Aufgrund dieser Tatsache zusammen mit der Tendenz präferentiell im Tumorgewebe zu akkumulieren und einer hohen Affinität zu nekrotisierendem Gewebe, ist Hypericin auch ein sehr gutes Diagnostikum in der Tumorlokalisation [37, 38].

Ist ausreichend Sauerstoff vorhanden, führt Hypericin hauptsächlich zur Bildung von Singulett-Sauerstoff durch die photochemische Typ-II Reaktion und zu einem geringeren Umfang zur Bildung von Superoxidanion durch die Typ-I Reaktion [39]. Der phototoxische Effekt von Hypericin ist sehr stark licht- und sauerstoffabhängig [40].

Neben der in der Literatur berichteten antiviralen Aktivität von Hypericin soll in dieser Arbeit vorwiegend die PDT und PACT Wirkung des PS beleuchtet werden.

1.4.2 Hypericin in der photodynamischen Therapie von Tumoren

Mögliche Aufnahmemechanismen für Hypericin in die Zelle sind Verteilungsvorgänge zwischen LDL und cholesterolreichen Domänen der Membran, Diffusion von PS-Monomeren und die Endozytose von PS-Aggregaten, welche nach der Aufnahme wieder in Monomere abgebaut werden können [34, 41]. Hypericin aus wässrigen Formulierungen wie den Hypericin-Cyclodextrin-Komplexen kann über transzelluläre Diffusion aufgenommen werden [41]. Innerhalb der Zelle akkumuliert Hypericin hauptsächlich in den Membranen des ER, des Golgi-Apparates, der Lysosomen und der Mitochondrien [40]. Dabei hat der Aufnahmemechanismus Einfluss auf die Lokalisation des PS innerhalb der Zelle. Das wiederum bestimmt, an welcher Zellstruktur der oxidative Schaden auftritt, und beeinflusst die Effizienz der PDT und die Art des Zelltods. PS, die eher in Mitochondrien und dem ER akkumulieren, induzieren Apoptose, während PS, die in der Zellmembran oder den Lysosomen angereichert werden, eher zu Nekrose der Zellen führen [42]. Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von Hypericin haben auch

Serumproteine. In deren Abwesenheit akkumulierte Hypericin hauptsächlich im ER. In LDL-angereichertem Medium, das Serum enthielt, wurde Hypericin hingegen über Endozytose aufgenommen und reichte sich somit im Lysosom an [43]. Hypericin-vermittelte PDT kann sowohl zu Apoptose und Nekrose als auch zu Autophagozytose führen. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmenden Hypericin- und Lichtdosen die Art des Zelltods von Apoptose Richtung Nekrose verschoben wurde [44]. Chen et al. fanden heraus, dass der Erfolg der PDT mehr von der Plasmakonzentration des Hypericin als von der intratumoralen Konzentration abhing. Die Schlussfolgerung daraus war, dass der antivaskuläre Effekt der Hauptmechanismus Hypericin-vermittelter PDT sein könnte [45]. Cavarga et al. zeigten, dass eine fraktionierte Gabe der Hypericindosis 1 h und 6 h vor der Bestrahlung zu einem besseren Ergebnis führte, als die Einmalgabe 1 h oder 6 h vor Therapie. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei einer besseren Verteilung im Gewebe, sowohl zytotoxische als auch antivaskuläre Effekte zu einem Therapieerfolg beitragen [46]. Außerdem ist Hypericin in der Lage eine Immunantwort anzuregen, es induziert die Exposition von damage-associated molecular patterns (DAMPs) auf Tumorzellen, wodurch die geschädigten Zellen vom angeborenen Immunsystem erkannt und phagozytiert werden [47]. Des Weiteren ist eine wichtige Zielstruktur des Hypericin das ER, welches eine Schlüsselrolle im sogenannten immunogenic cell death (ICD) spielt [48].

Derzeit gibt es drei klinische Studien, die Hypericin vermittelte PDT an verschiedenen Hauttumoren und Psoriasis getestet haben. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Hypericin vermittelte PDT eine vielversprechende Methode zur Therapie verschiedener Hautkrankheiten darstellt [40].

1.4.3 Hypericin in der photodynamischen antimikrobiellen Chemotherapie

Da Hypericin eine negative Ladung besitzt, ist die photodynamische antibakterielle Wirkung auf grampositive Keime begrenzt, durch deren Peptidoglykanschicht der PS gut diffundieren kann. Die stark negativ geladene äußere Membran der gramnegativen Bakterien hingegen stellt eine effektive Permeationsbarriere für den PS dar. So bewirkt Hypericin-PACT eine Reduktion von mehr als 6 log₁₀ Stufen bei Methicillin-sensitiven und –resistenten *S. aureus* Stämmen, aber nur von weniger als 0,2 log₁₀ Stufen bei *E. coli* [49]. Der gleiche Effekt konnte für wasserlösliche Formulierungen des PS (PVP-Hypericin) und für in Pluronic P123

verkapseltes Hypericin beobachtet werden, die beide einen antibakteriellen Effekt auf *S. aureus*, jedoch keine Wirkung auf *E. coli* zeigten [50, 51]. Dabei ist nach der „American Society for Microbiology“ der antibakterielle Effekt definiert als eine Keimreduktion von mindestens 3 log₁₀ [52]. Melo et al. konnten den photodynamischen Effekt von Hypericin auf *E. coli* (0,9 log₁₀ Reduktion) durch Elektroporation auf 3,3 log₁₀ verstärken [53].

Auch für die Behandlung von *in vitro* Biofilmen wurde Hypericin untersucht. Die Hypericin-vermittelte photodynamische Inaktivierung von *S. aureus* Biofilmen ist abhängig von der Biofilmstärke und erfordert wesentlich höhere PS und Lichtkonzentrationen sowie Inkubationszeiten als die Behandlung planktonischer Bakterien [54].

1.5 Liposomen

1.5.1 Definition, Aufbau und Eigenschaften

Liposomen sind Vesikel, die aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten bestehen und dabei ein wässriges Kompartiment umschließen. 1964 wurden diese, den biologischen Membranen sehr ähnlichen Strukturen, von Bangham und Horne erstmals beschrieben und elektronenmikroskopisch abgebildet [55]. So wurden sie anfänglich nach ihrem Entdecker „Banghasomes“ genannt [56]. Liposomen besitzen einen Größenbereich von 20 nm bis zu mehreren µm und zählen pharmazeutisch gesehen zu den kolloiddispersen Systemen. Je nach Größe und Anzahl der konzentrischen Doppelschichten werden sie in kleine unilamellare Vesikel (SUV's), große unilamellare Vesikel (LUV's) oder große multilamellare Vesikel (MLV's) unterteilt.

Zur Herstellung von Liposomen werden hauptsächlich die amphiphilen Glycerophospholipide verwendet. Diese bestehen aus einem Glycerolmolekül, dem sogenannten Rückgrat, welches an C1 und C2 mit Fettsäuren verestert ist. Die Kohlenstoffketten der Fettsäuren bilden den apolaren Teil des Moleküls. Dabei unterscheiden sich Kettenlänge und Sättigungsgrad, was einen Einfluss auf die Stabilität, die Permeabilität und das Phasenverhalten der Lipide hat. An C3 ist das Glycerol über eine Phosphodiesterbindung mit einem Alkohol verestert. Dieser polare Teil des Lipids wird auch Kopfgruppe genannt und kann entweder geladen (positiv oder negativ), zwitterionisch oder ungeladen vorliegen und bedingt die hydrophilen Eigenschaften des Lipids. In Abbildung 5 sind einige der in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide dargestellt. Die Phospholipide eines Liposoms können in einem Gel-Zustand vorliegen, der

durch eine dichte Packung der Kohlenstoffketten gekennzeichnet ist, oder in einem flüssigkristallinen Zustand, in dem die Ketten sehr ungeordnet vorliegen. Dieser Übergang vom Gel zum flüssigkristallinen Zustand findet statt, wenn die Phasenübergangstemperatur (T_c) erreicht ist, welche von der jeweiligen Lipidzusammensetzung und dem die Liposomen umgebenden Medium abhängig ist [57].

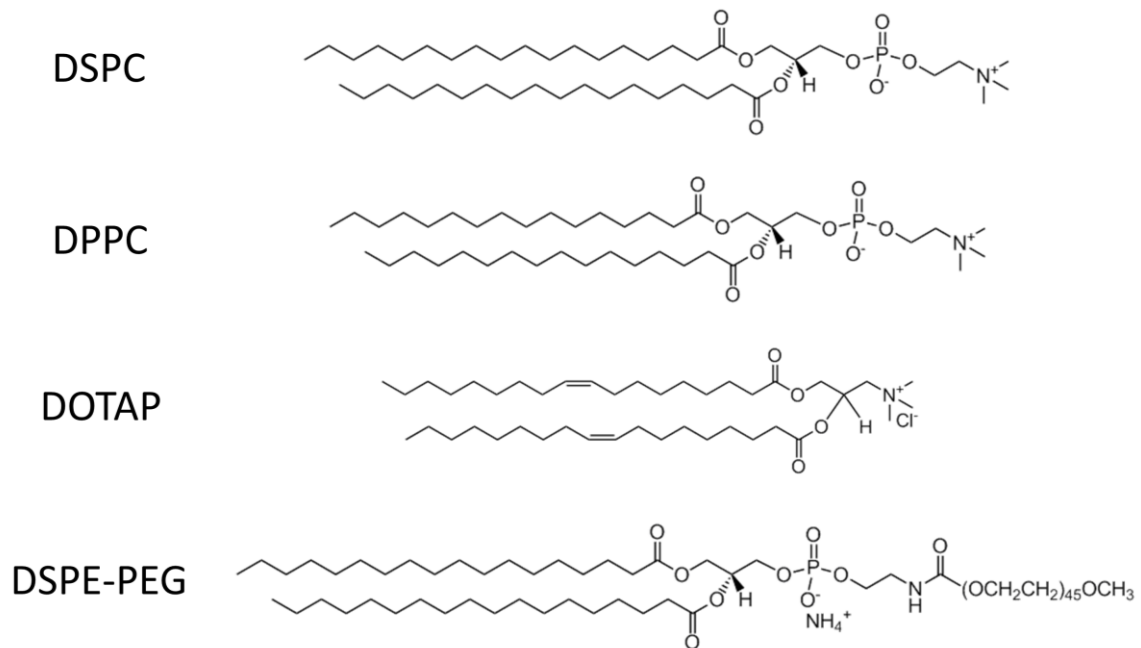


Abbildung 5: Struktur von in dieser Arbeit verwendeten Glycerophospholipiden

1.5.2 Liposomen als Arzneistoffträgersysteme

Gregoriadis et al. schlugen 1971 Liposomen erstmals als Arzneistoffträgersysteme vor [58]. Dabei können hydrophile Substanzen im Inneren und hydrophobe Substanzen in der Membran der Liposomen verkapselt werden. Neben den konventionellen Liposomen gibt es auch oberflächenmodifizierte Versionen, die ein optimiertes *in vivo* Verhalten aufweisen. Werden Liposomen in das Blut injiziert, können sie mit Lipoproteinen über einen Austausch von Lipiden interagieren, was zu einer Destabilisierung der Membran führt. Des Weiteren findet eine Anlagerung von Opsoninen (Immunglobuline) auf den Liposomen statt, wodurch Phagozytose durch Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) vermittelt wird [57]. Beide Mechanismen reduzieren die Zirkulationszeit der Liposomen. Diese kann verlängert werden durch Modifikation der liposomalen Oberfläche mit hydrophilen und flexiblen Polymeren wie

Polyethylenglycol (PEG), die Plasmaproteine abschirmen und an der Bindung hindern (Stealth-Liposomen) [59]. Außerdem besteht die Möglichkeit Liposomen aktiv an ihren Zielort zu bringen, indem man Liganden wie Antikörper, Peptide oder Kohlenhydrate an die Oberfläche bindet, welche spezifisch an Strukturen wie Rezeptoren oder Zelladhäsionsmolekülen des Zielgewebes binden (Abb. 6) [60].

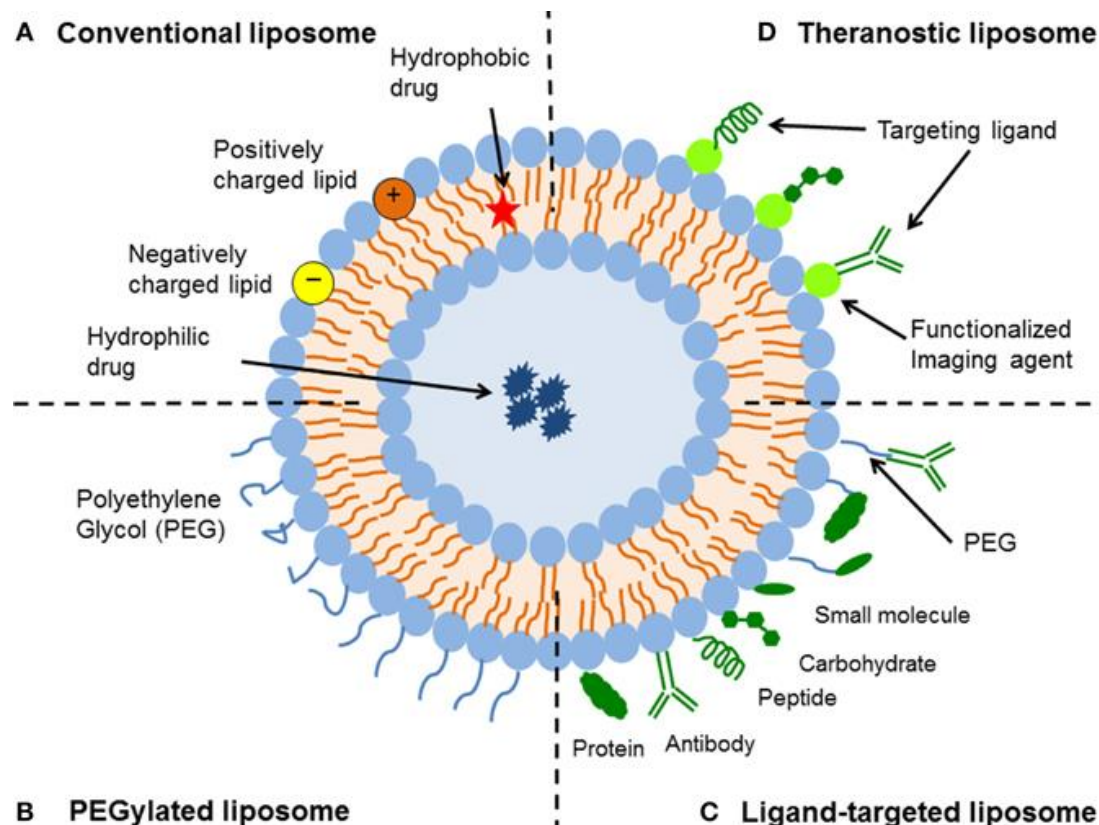


Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten für eine liposomale Oberflächenmodifikation [60]

Liposomen weisen viele Vorteile als Trägersysteme für PS auf, wie die hohe Verkapselungseffizienz, Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und die Möglichkeit zur physikochemischen und biophysischen Modifikation, um ihr in vivo Schicksal anzupassen. Im Fall von hydrophoben PS, die in wässrigen Medien aggregieren würden, sorgt die liposomale Verkapselung für das Vorliegen von PS-Monomeren. Dadurch wird gewährleistet, dass die PS ihre Photoaktivität nicht durch Aggregation verlieren. Außerdem konnte die verbesserte Aufnahme von PS in Tumorgewebe nach Inkorporation in die Vesikel beobachtet werden [61]. Dies macht die Therapie effizienter und sicherer. Des Weiteren diffundieren liposomale PS in ihrer monomeren Form in das Blut und zeigen somit eine andere Verteilung zwischen

Plasmaproteinen als PS die in einem aggregierten Zustand appliziert werden. Auch das kann die PDT positiv beeinflussen [61, 62].

In der PACT zeigten vor allem kationische Liposomen eine Verbesserung der photodynamischen Aktivität von Porphyrinen gegenüber methicillin resistenten *S. aureus*. Durch die positive Ladung der Carrier binden diese besser an die Bakterienmembran und stören deren Integrität, was zu einer besseren Aufnahme des PS führt [63, 64]. Yang et al. untersuchten, ob Liposomen die photodynamische Wirkung von Temoporfin gegenüber grampositiven wie auch gramnegativen Bakterien verbessern können. Dabei erreichten konventionelle Liposomen nur eine $2,6 \log_{10}$ Reduktion von *S. aureus* und eine ca. $1,5 \log_{10}$ Reduktion von *P. aeruginosa*. Ein antibakterieller Effekt konnte erst erzielt werden, nachdem die Liposomenoberfläche mit antibakteriellen Peptiden modifiziert wurde [65].

1.5.3 pH-sensitive Liposomen

Die pH-sensitiven Liposomen wurden hauptsächlich im Bereich der Tumorthherapie erforscht, um Chemotherapeutika intrazellulär freizusetzen und dadurch Resistenzen zu überwinden. Dabei führt eine Destabilisierung der Liposomen durch den sauren pH-Wert des Endosoms zu einer Interaktion mit der endosomalen Membran [66]. Diese kann entweder ihrerseits destabilisiert werden oder das Liposom fusioniert mit der Membran. Des Weiteren nutzen pH-sensitive Liposomen die Tatsache aus, dass der pH-Wert in Tumorgewebe und in Entzündungs- oder Infektionsherden niedriger ist als in gesundem Gewebe. Die am häufigsten verwendete Komponente von pH-sensitiven Liposomen ist ein Phosphatidylethanolamin wie beispielsweise DOPE. Dieses Lipid hat eine relativ kleine und wenig hydratisierte Kopfgruppe und bildet über der T_c (10 °C), inverse Mizellen aus (Abb. 7A). Dies ermöglicht die Konusform des Lipids und die dadurch bedingte, starke Interaktion zwischen den Amin- und Phosphateinheiten der Kopfgruppen. Gibt man zu dem Lipid eine pH aktive Komponente wie Cholesterolhemisuccinat (CHEMS), deren Carboxylgruppe bei physiologischen pH-Wert deprotoniert vorliegt, wird die elektrostatische Abstoßung der Kopfgruppen und die Ausbildung von Doppelschichten ermöglicht (Abb. 7B). Eine Protonierung des CHEMS führt zur Destabilisierung der Liposomen [66]. PE/CHEMS Liposomen die einen hydrophoben PS enthielten, waren bei der Therapie von Blasenkarzinomzellen *in vitro* nicht pH-sensitiven PC/CHEMS Liposomen überlegen [61]. Nicolosi et al. zeigten, dass es möglich ist, mit

DOPE/CHEMS Liposomen, welche Vancomycin enthielten, eine hohe Effektivität des Antibiotikums bei bereits resistenten *E. coli* zu erzielen. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass die fusogenen Eigenschaften der Liposomen es ermöglichen, mit der äußeren Membran zu interagieren und das Antibiotikum an den Wirkort zu bringen. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass klassische Liposomen keine Verbesserung der Vancomycin Wirkung erzielen [67].

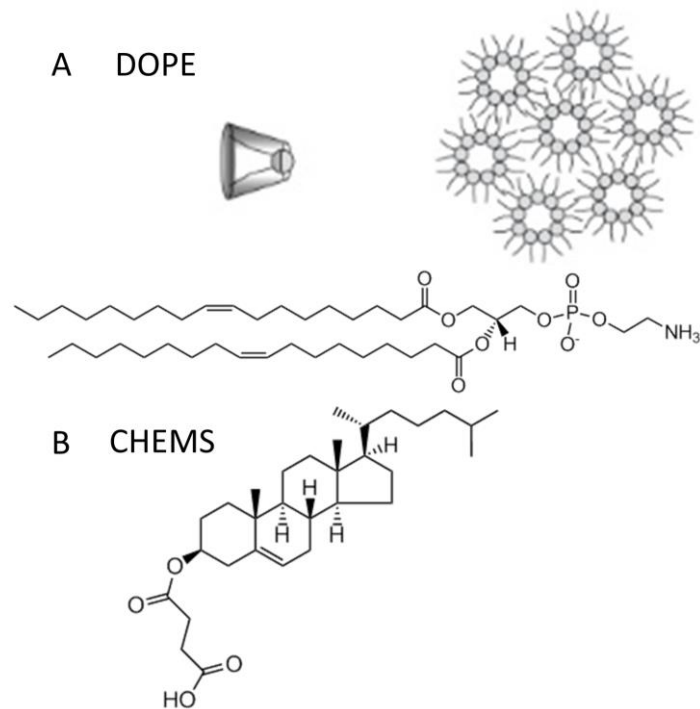


Abbildung 7: Struktur von DOPE (A) und CHEMS (B)

1.5.4 Wirkstoff-Cyclodextrin Komplexe verkapselt in Liposomen

Nach Herstellung eines wasserlöslichen Komplexes hydrophober Wirkstoffe ist es auch möglich, diese im wässrigen Kompartiment der Liposomen zu verkapseln. Dadurch kann man ein höheres Wirkstoff-Lipid Verhältnis erreichen und ungünstige Einflüsse des Wirkstoffs auf die Lipidmembran umgehen [68]. Eine Möglichkeit, Komplexe zu bilden, ist die Verwendung von Cyclodextrinen, welche durch den Abbau von Stärke mit Hilfe bakterieller Enzyme hergestellt werden. Cyclodextrine sind zyklische, (α -1,4) verknüpfte Oligosaccharide der α -D-Glucopyranose, die ein hydrophobes Inneres und ein hydrophiles Äußeres besitzen (Abb. 8).

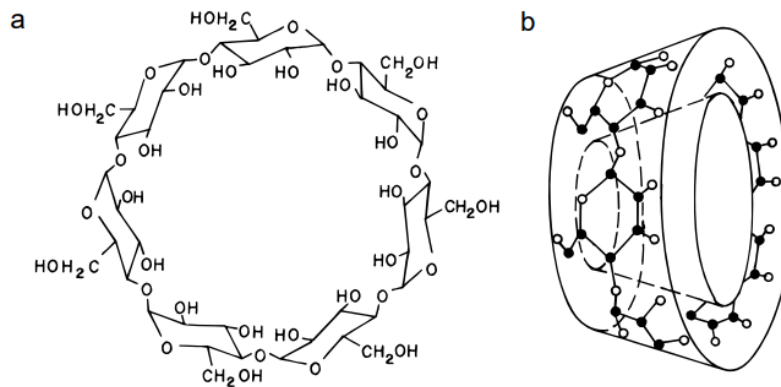


Abbildung 8: (a) Chemische Struktur und (b) Konusform des β -Cyclodextrins [69]

Natürlich vorkommende Cyclodextrine (CD) sind α -, β - und γ -CD, mit jeweils 6, 7 und 8 Glucopyranose-Einheiten. Da keine freie Drehbarkeit um die Bindungen möglich ist, resultiert aus der energetisch günstigsten Anordnung eine Konusform [69]. Aufgrund der hohen Kristallenergie dieser kristallinen Struktur und der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den sekundären OH-Gruppen sind Cyclodextrine schlecht wasserlöslich. Natürliches β -CD hat beispielsweise eine Wasserlöslichkeit von nur 1,85% (w/v). Um die Löslichkeit in Wasser zu erhöhen, kann man die freien OH-Gruppen substituieren und erhält dann Verbindungen wie (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP β CD) mit einer Löslichkeit von 60% (w/v). HP β CD bildet Einschlussverbindungen mit hydrophoben Molekülen, indem sich Van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der hydrophoben Höhle des Cyclodextrins und dem Gast-Molekül ausbilden [69]. Dadurch ist es möglich, die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit hydrophober Wirkstoffe zu erhöhen. Werden die Einschlussverbindungen intravenös verabreicht, dissoziiert der Komplex und der Wirkstoff wird metabolisiert wie „freier Wirkstoff“, während das Cyclodextrin über die Nieren ausgeschieden wird [70]. Durch Verkapselung des Komplexes in Liposomen kann das *in vivo* Schicksal des Komplexes hingegen gesteuert werden. So können die Vorteile der beiden *Arzneistoffträgersysteme* zu einem System (Wirkstoff/Cyclodextrin Komplex in Liposomen) vereinigt werden.

1.5.5 Tetraetherlipide

Thermacidophile Archeabakterien wie *Sulfolobus acidocaldarius* erreichen ihr Wachstumoptimum unter extremen Bedingungen von 70-80 °C und einem pH-Wert von 2-3, wie sie in heißen, sauren Quellen herrschen [71]. Um in diesen rauen Umgebungen ihre biologischen Funktionen aufrecht zu erhalten, sind die Archaeen unter anderem mit Membranlipiden von besonderer chemischer Struktur ausgestattet. Diese unterscheiden sich zu den Phospholipiden von Eukaryoten und Bakterien in mehreren Punkten. Die Verknüpfung der Kohlenstoffketten mit dem Glycerol-Rückgrat erfolgt bei Archaeen über Etherbrücken, welche über einen langen pH-Bereich stabil bleiben. Außerdem setzen sich die Kohlenstoffketten aus Phytanen (Isoprenoid-Einheiten) zusammen, die verzweigte Methylgruppen besitzen und somit die Permeabilität und Kristallisationsneigung der Membran herabsetzen. Die Packungsdichte der Membran wird bei manchen Lipiden außerdem durch das Auftreten von Fünfringstrukturen erhöht, somit bleibt die Membranfluidität bei hohen Temperaturen gering. Auch die Stereochemie des Glycerols unterscheidet sich zu der von eukaryotischen und bakteriellen Lipiden und damit auch die Empfindlichkeit gegenüber Enzymen [72]. Des Weiteren tragen die polaren Kopfgruppen der Lipide Zuckerreste, welche Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und die Membran zusätzlich stabilisieren [73]. Die aus *Sulfolobus acidocaldarius* isolierte, polare Lipidfraktion E (PLFE), besteht zu 90% aus Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT / Calditocaldarcheol) und zu 10% aus Glycerol-dialkyl-glyceryl-tetraether (GDGT / Caldarcheol) (Abb. 9A). Diese beiden Grundtypen der sogenannten Tetraetherlipide (TEL) bestehen aus zwei Biphytanylketten (C₄₀), die an beiden Enden jeweils über Etherbindungen an ein Glycerolmolekül geknüpft sind. Beide tragen an einem Ende eine Phosphatidyl-myo-inositol Gruppe. An dem anderen Ende besitzt GDNT eine ringförmige Nonitolgruppe (Calditolgruppe), die mit β -D-Glucose verknüpft ist, während GDGT eine β -D-Galactosyl-D-glucose Gruppe aufweist [73]. Die bipolaren Tetraetherlipide bilden innerhalb von Membranen und so auch Liposomen Monolayer aus, indem sie die Membran komplett durchspannen (Abb. 9B). Diese Organisation der Lipide führt zusätzlich zu einer Steigerung der Rigidität der Membran [74].

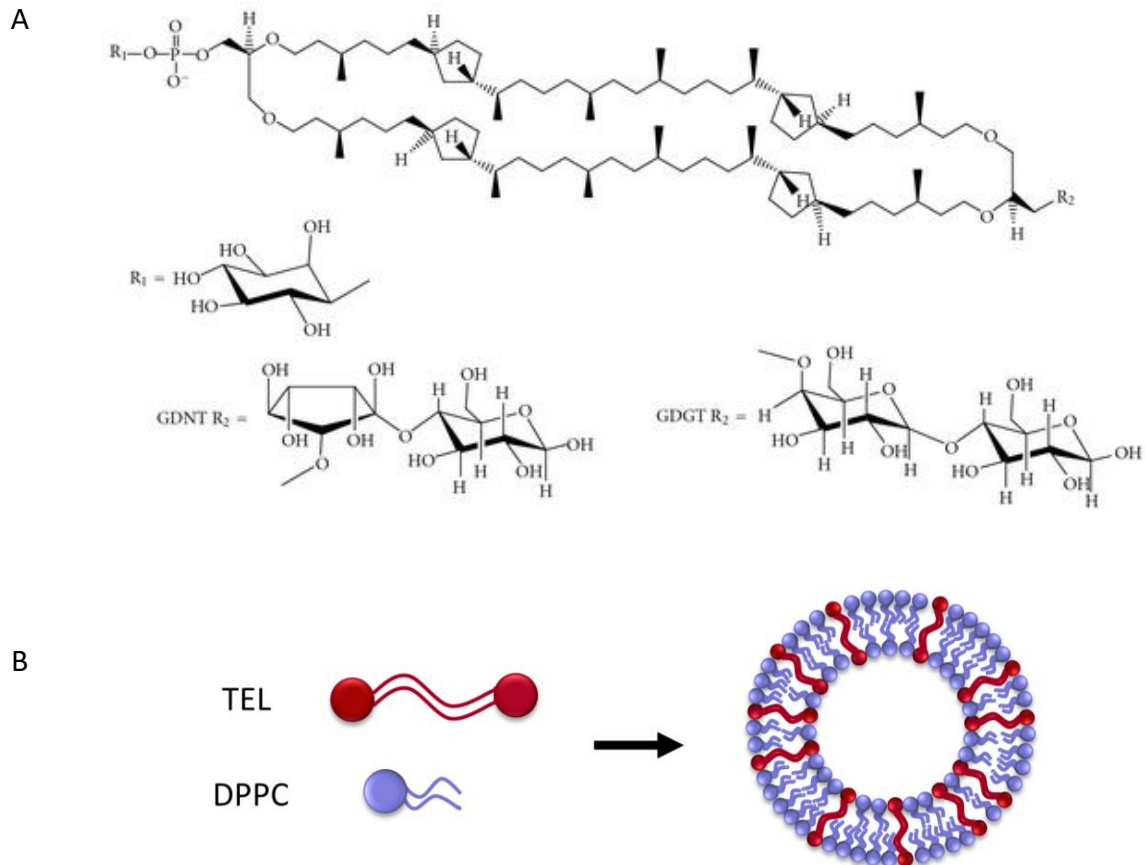


Abbildung 9: (A) Struktur der Tetraetherlipide Glycerol-dialkyl-nonitol-tetraether (GDNT / Calditocaldarcheol) und Glycerol-dialkyl-glycerol-tetraether (GDGT / Caldarcheol) (B) Einlagerung der Tetraetherlipide in die liposomale Membran

1.5.6 Hypericin-Liposomen in der photodynamischen Therapie

Liposomales Hypericin zur Anwendung in der PDT wurde erstmals 2001 von Derycke et al. untersucht. Die Arbeitsgruppe verglich konventionelle PEG-Liposomen mit Transferrin-modifizierten-PEG-Liposomen bezüglich der Aufnahme in HeLA-Zellen und der Phototoxizität. Dabei zeigten die modifizierten Vesikel keinen Vorteil gegenüber den konventionellen Liposomen. Des Weiteren wurde Hypericin in Gegenwart von Serum aus den Liposomen freigesetzt. Die Arbeitsgruppe folgerte daraus, dass Hypericin stabiler in Liposomen verkapselt werden muss, um in der PDT eingesetzt werden zu können [75]. Galanou et al. verbesserten die Aufnahme und Phototoxizität von liposomalem Hypericin in DU145 Zellen durch Modifizierung der Membran mit Guanidiniumgruppen [76]. Fadel et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Verkapselung von Hypericin in Liposomen zu einer schlechteren Aufnahme in HepG2 Zellen und geringeren photodynamischen Aktivität verglichen mit freiem Hypericin

und an anti-HSA (anti-hepatocyte specific antigen) gebundenem Hypericin führt [77]. Insgesamt weist die Literatur somit darauf hin, dass Liposomen ein geeigneter Carrier für Hypericin in der PDT sein können. Allerdings muss dieses stabil verkapselt werden, um eine Freisetzung von Hypericin aus den Liposomen in Gegenwart von Plasmaproteinen zu vermeiden. Dieses Ziel könnte erreicht werden, indem man die Membran durch Verwendung von TEL-Lipiden stabilisiert oder Hypericin im wässrigen Kompartiment der Liposomen verkapselt. Dazu kann das Hypericin in einen Hypericin-Cyclodextrin Komplex überführt werden. Für die photodynamische Inaktivierung von Bakterien wurde liposomales Hypericin bis jetzt noch nicht untersucht.

1.6 Aufgaben und Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer liposomalen Formulierung von Hypericin, die nicht nur für die lokale, sondern auch für die intravenöse Applikation in der photodynamischen Therapie geeignet ist.

Hypericin ist eine sehr lipophile Substanz die eine schlechte Wasserlöslichkeit und ein geringes intestinales Permeationsvermögen zeigt (BCS Klasse IV). Somit besteht neben dem Problem der schlechten Bioverfügbarkeit zusätzlich die Herausforderung, die geringe Löslichkeit von Hypericin zu überwinden. Daher ist die Entwicklung einer wässrigen Formulierung von Hypericin notwendig, um den vielversprechenden PS tatsächlich im klinischen Alltag am Patienten anwenden zu können. Eine Voraussetzung, die diese Formulierung gewährleisten muss, ist die Erhaltung oder Verbesserung der photodynamischen Aktivität von Hypericin. In der Literatur sind bereits einige Ansätze, Hypericin in eine wässrige Formulierung zu überführen, beschrieben. Darunter Komplexe von Hypericin mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) oder HP β CD, die jedoch eine schnelle renale Clearance nach intravenöser Applikation besitzen. Weiterhin Hypericin-Liposomen, welche allerdings während der *in vitro* Testung eine frühzeitige Freisetzung des PS aus den Vesikeln zeigten. Den Grund dafür sahen die Autoren in der hohen Affinität von Hypericin zu Plasmaproteinen.

Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren werden die folgenden Schritte durchgeführt:

- 1) Zwei verschiedene Strategien zur Verkapselung von Hypericin in Liposomen sollen verglichen werden. Zum einen wird Hypericin mit Hilfe der Filmmethode in die Liposomenmembran eingelagert und zum anderen wird eine Einschlussverbindung aus Hypericin und HP β CD mit Hilfe der DRV-Methode in das wässrige Kompartiment der Liposomen verkapselt. Beide Methoden sollen stabile Liposomen ergeben, deren physikochemische Eigenschaften mit Hilfe des Zetasizer Nano ZS, der Rasterkraftmikroskopie sowie der Größenausschlusschromatographie bestimmt werden. Das Problem der geringen Löslichkeit kann dadurch gelöst werden.

- 2) Das *in vivo* Schicksal des Hyp-HP β CD Komplexes kann durch den Einschluss in Liposomen positiv beeinflusst werden. Eine längere Zirkulationszeit des Komplexes im Blutkreislauf könnte die Anreicherung im Tumorgewebe erhöhen. Des Weiteren kann man die Freisetzung von Hypericin aus Liposomen durch Bindung an Plasmaproteine reduzieren, indem der Einschluss des PS im wässrigen Kompartiment der Liposomen erfolgt. Somit könnte die Verkapselung des Hypericin-Komplexes zwei erhebliche Vorteile haben.
- 3) Eine weitere Möglichkeit, stabile Hypericin-Liposomen herzustellen, ist die Erniedrigung der Membranpermeabilität. Aus diesem Grund werden für die Herstellung der Liposomen unter anderem Tetraetherlipide, die aus Archaeen isoliert werden konnten, verwendet. Diese bipolaren Moleküle führen aufgrund ihrer besonderen chemischen Struktur zu einer sehr rigiden Liposomenmembran und verringern somit auch deren Permeabilität.
- 4) Die photodynamische antibakterielle Aktivität der Liposomen soll *in vitro* auf Suspensionsbakterien und Biofilmen sowie im Hühnerembryomodell erforscht werden. Die Phototoxizität gegenüber Tumorzellen wird auf SK-OV-3 Zellen untersucht, während die antivaskulären Effekte der Hypericin-Liposomen im CAM-Modell dargestellt werden. Des Weiteren erfolgt die Ermittlung der Hämokompatibilität der verschiedenen Formulierungen und deren bevorzugter Endozytosewege.

2 Methoden

2.1 Herstellung der Hypericinformulierungen

2.1.1 Extraktion der Tetraetherlipide

Tetraetherlipide konnten nach einer bereits beschriebenen Methode durch Extraktion, aus der lyophilisierten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* (Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH, Heiligenstadt, Deutschland) gewonnen werden [78]. 6 g der Archaeen-Rohmasse wurden fein gemörsert, um ein grün/braunes Pulver zu erhalten. Nach Überführung des Pulvers in eine Extraktionshülse konnte diese in eine Soxhlet-Apparatur eingebracht werden. Als Extraktionsmittel diente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (50/50 v/v), welches sich in einem 500 ml Rundkolben befand. Nach einer 48 stündigen Extraktion bei +80 °C, wurde das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers Heidolph Laborota 4000 efficient (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) entfernt und der erhaltene Lipidfilm in wenig $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gelöst. Zur Aufreinigung der Lipidmasse wurde eine Säule mit Chromabond C-18 gepackt. Nach dem Aufbringen der Lipide auf die Säule konnte mit Seesand überschichtet werden. Die Elution erfolgte unter Verwendung folgender Lösungsmittel: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50 v/v), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (22,5/55/22,5 v/v/v) und $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70/26/4 v/v/v). Die erhaltenen Fraktionen wurden unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie charakterisiert. Die Ausbeute der polaren Lipidfraktion E (PLFE) betrug 65,7 mg.

2.1.2 Einschlussverbindung von Hypericin in (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin

Die Herstellung der Einschlussverbindungen von Hypericin in (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP β CD) erfolgte in Anlehnung an die Methode von McCormack et al. [79]. Zuerst wurde Hypericin in Methanol gelöst, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml zu erhalten. Im Anschluss an das Pipettieren von 1,5 ml der Stammlösung in einen Rundkolben konnte das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers Heidolph Laborota 4000 entfernt werden, woraus ein dünner Hypericinfilm resultierte. Die Rehydrierung des Films mit einer 50 °C warmen, wässrigen Lösung von 50 mg/ml HP β CD führte zur Bildung einer klaren Flüssigkeit, welche im Anschluss 10 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) bei 50 °C beschallt und danach über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren stehen gelassen wurde. Das Hypericin wurde dabei über hydrophobe Wechselwirkungen im Inneren des konusförmigen cyclischen HP β CD

eingeschlossen (Abb. 10). Das Filtrieren der Lösung durch einen 0,22 µm Nylon Filter diente zur Abtrennung gebildeter Aggregate. Die Lagerung der Einschlussverbindung erfolgte im Kühlschrank.

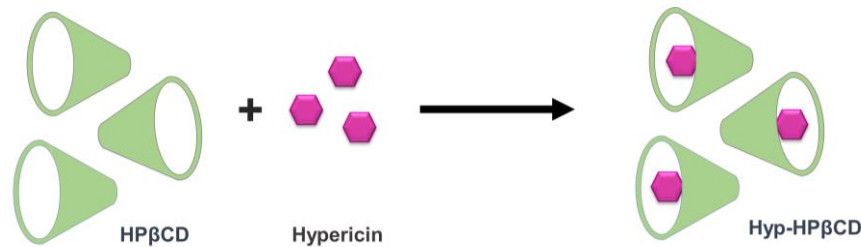


Abbildung 10: Bildung der Einschlussverbindung Hyp-HPβCD von Hypericin in (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD)

2.1.3 Hypericin-Liposomen

2.1.3.1 Filmmethode

Die Lipide 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-cholin (DSPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-cholin (DPPC), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-(polyethylenglycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE), Cholesteryl-hemisuccinat (CHEMS) und 1,2-Dioleoyl-3-trimethyl-ammoniumpropan (DOTAP) (alle bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) wurden in Chloroform/Methanol (2:1 v/v) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die polare Lipidfraktion E (PLFE), welche die Tetraetherlipide Caldarchaeol (GDGT) und Calditoglycerocaldarchaeol (GDNT) enthält, konnte aus der gefriergetrockneten Biomasse von *Sulfolobus acidocaldarius* mittels Extraktion und Aufreinigung wie in 2.1.1 beschrieben gewonnen werden und lag in einer 10 mg/ml Stammlösung in Chloroform/Methanol (2:1 v/v) vor. Für die Herstellung der Liposomen nach der Filmmethode wurden die Lipide in einer Gesamtkonzentration von 10 µmol in Rundkolben pipettiert [80]. Dabei wurden verschiedene molare Verhältnisse gewählt: DOPE/CHEMS/DPPC 40/40/20, DSPC/DPPC/DSPE-PEG 75/20/5, DPPC/DOTAP 95/5, DSPC 100 und DPPC/TEL 90/10. Durch das Entfernen des Lösungsmittels mit Hilfe eines Rotationsverdampfers konnte ein gleichmäßiger Film der Lipidmischungen erhalten werden. Rehydratisierung mit einem Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer 0,15 mol/l) führte zu der gewünschten liposomalen Formulierung mit einer Lipidgesamtkonzentration

von 10 $\mu\text{mol/ml}$. Davor musste der PBS-Puffer auf die Phasenübergangstemperatur des rigidesten Lipids der Mischung erwärmt werden. Unter starkem Schütteln des Kolbens und Zuhilfenahme des Ultraschallbads löste sich der Film vollständig von der Glaswand und es bildeten sich multilamellare Vesikel (MLV's). Anschließend folgte die Beschallung der Liposomen im Ultraschallbad bei maximaler Energie und einer Wasserbadtemperatur von 60 °C für 20 min, um unilamellare Vesikel zu erhalten. Für die Herstellung Hypericin-beladener Liposomen wurde der Lipidmischung vor dem Verdampfen des Lösungsmittels die gewünschte Menge methanolische Hypericin-Stammlösung hinzupipettiert (Abb. 11).

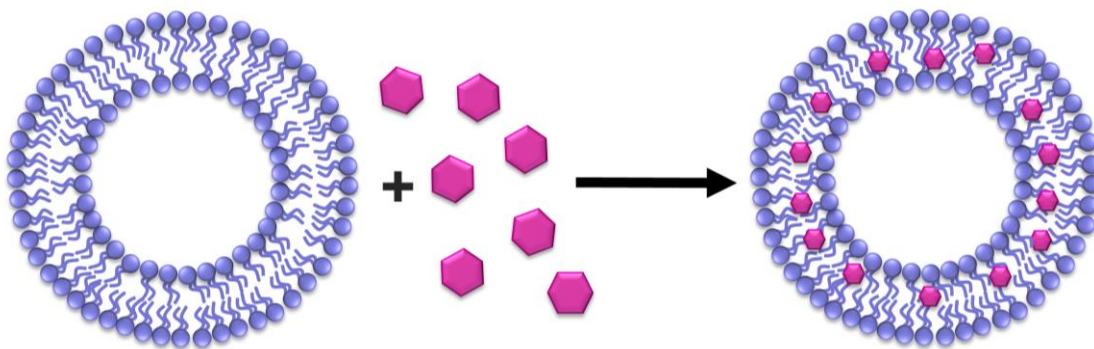


Abbildung 11: Verkapselfung von Hypericin in Liposomen

2.1.3.2 Dehydration-Rehydration-Vesicle Methode

Der Hyp-HP β CD Komplex wurde mit Hilfe der Dehydration-Rehydration-Vesicle (DRV) Methode in Liposomen verkapselfelt [81]. Unter Verwendung der Filmmethode entstanden leere Liposomen bestehend aus DSPC/DPPC/DSPE-PEG (80/15/5 mol%), DSPC (100 mol%) und DPPC/TEL (90/10 mol%). Jeweils 1 ml der Leerliposomen wurde mit einem definierten Volumen Hyp-HP β CD Lösung in einen Rundkolben pipettiert, um eine Hypericin-Gesamtkonzentration von 200 $\mu\text{g/Kolben}$ zu erhalten. Anschließend führte das Schwenken des Kolbens in flüssigem Stickstoff zu einem raschen Einfrieren der Mischung und der Ausbildung einer großen Oberfläche. Auf die Gefriertrocknung folgte die Rehydrierung des Lyophilisats mit 200 μl warmen Milli-Q-Wasser. Nach Equilibrierung der Lösung für 30 min in einem 60 °C warmen Wasserbad wurden 800 μl PBS-Puffer ergänzt und weitere 30 min im Wasserbad inkubiert. Das Gefriertrocknen der Liposomen führt zu einer Störung der Membranintegrität der Liposomen in Gegenwart des Hyp-HP β CD Komplexes. Während des Rehydrierens erfolgt dann eine Rekonstitution der Liposomen mit gleichzeitiger Verkapselfung

des Komplexes (Abb. 12). Das Abtrennen des freien Hyp-HP β CD Komplexes erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Sephadex G-25 Säule (PD-10 Columns, GE Healthcare, Deutschland), wie in 2.2.4 beschrieben.

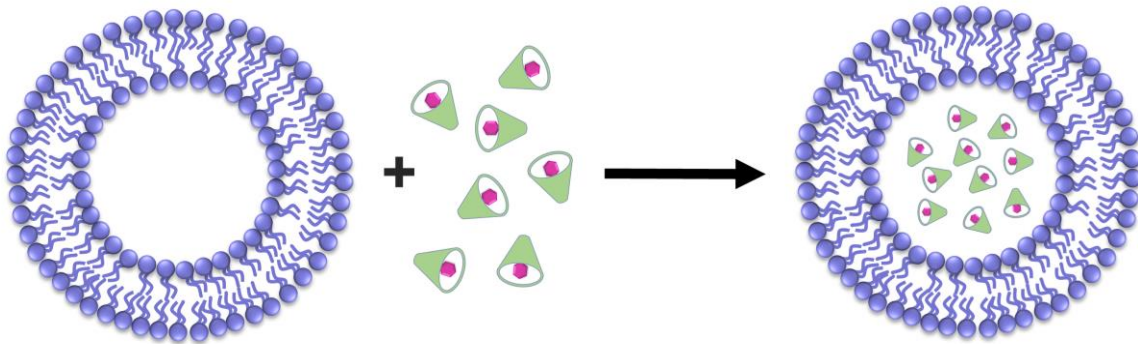


Abbildung 12: Hyp-HP β CD Komplex verkapselt in Liposomen

2.1.4 Beschichtung von Polyurethan mit dem Layer-by-Layer Verfahren

Kathetermaterial bestehend aus Polyurethan (PUR) sollte mit Hypericin beschichtet werden, um die antibakterielle photodynamische Wirkung *in vitro* zu testen. Mit dem Layer-by-Layer Verfahren war es möglich die Oberfläche von PUR-Röhrchen zu modifizieren und Filme, bestehend aus PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD, PLGA_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD und PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD, herzustellen. Röhrchen mit einer Länge von 3 cm und einem Volumen von 380 μ l wurden dreimal mit Milli-Q-Wasser gespült und anschließend 10 min mit Aceton in einem Ultraschallbad gereinigt. Das Auflösen von 150 mg Resomer 503 H (50:50 lactide/glycolide PLGA, Evonik, Darmstadt, Deutschland) in 15 ml Aceton ergab eine Stammlösung von 10 mg/ml. Chitosan (M: 190 000-300 000 g/mol) wurde in 1%iger Essigsäure unter Rühren über Nacht gelöst, um eine Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml zu erhalten. Zuerst fand eine 40-minütige Inkubation der Röhrchen in PLGA-Lösung statt. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit Ethanol. PLGA bildete einen stabilen, dünnen Film auf PUR als Basis für die Beschichtung aus, der nach dem Trocknen 40 min in Chitosan-Lösung inkubiert wurde. Es konnten sich so elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den in Wasser deprotonierten Carboxylgruppen des PLGA's und den protonierten Aminogruppen des Chitosans ausbilden. Überschüssiges Chitosan wurde durch Spülen mit Milli-Q-Wasser entfernt. Nach dem Trocknen konnten die Röhrchen für 40 min mit Hyp-HP β CD oder DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen inkubiert werden. Dies führte zu elektrostatischen

Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Chitosan und den negativ geladenen Hypericinformulierungen (Abb. 13). Chitosan fungiert hier als Vernetzer und weist außerdem noch antibakterielle Eigenschaften auf [82]. Es folgte im Anschluss ein Waschschriff mit Milli-Q-Wasser und eine Trocknung unter Stickstoff-Begasung. Der PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD Film erhielt eine weitere vernetzende Chitosan Schicht, um eine zusätzliche DSPC/Hyp-HP β CD Schicht zu binden. Die Lagerung der befilmten Röhrchen erfolgte im Kühlschrank.

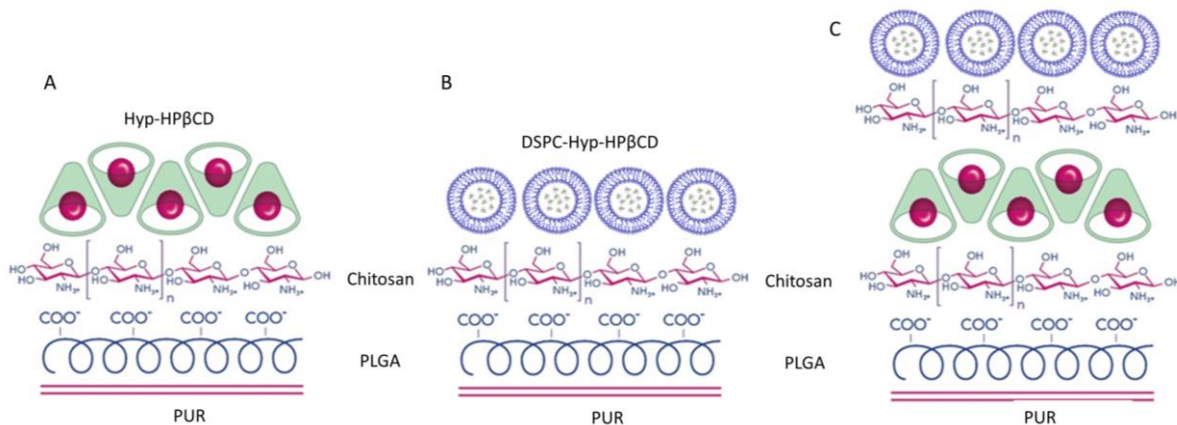


Abbildung 13: Beschichtung von PUR mit (A) PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD, (B) PLGA_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD und (C) PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD

2.2 Charakterisierung der Hypericin-Liposomen

2.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Unter Verwendung des Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) konnte der hydrodynamische Durchmesser der Liposomen bestimmt werden. Das zu Grunde liegende Messprinzip ist die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) oder dynamische Lichtstreuung (DLS). Dabei wird Licht eines HeNe Lasers, welches in die Probenzelle eingestrahlt wird, durch in der Probensuspension enthaltene Partikel gestreut. Das Streulicht kann in einem 173° Winkel von einem Photomultiplier zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert werden. Große Partikel zeigen dabei weniger starke Schwankungen in der Streulichtintensität als kleine Partikel, da diese langsamer im Medium diffundieren. Folglich dient die Brown'sche Molekularbewegung als Grundlage des Messprinzips. Der Computer ermittelt über die Berechnung einer Korrelationsfunktion die Diffusionskonstante der Partikel, welche anschließend durch Einsetzen in die Stokes-Einstein-Gleichung den Partikelradius

ergibt. Die tabellierten Werte ergaben sich aus Messungen von jeweils drei unabhängigen Proben und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der Intensitätsauswertung dargestellt. Der Polydispersitätsindex (PDI) ist ein einheitsloses Maß für die Einheitlichkeit der Größenverteilung. Liegt dieser unter 0,2 geht man von einer monomodalen Verteilung aus, während ein Wert darüber auf das Vorliegen mehrerer Größenklassen hindeutet.

2.2.2 Laser-Doppler-Anemometrie

Auch die Messung des Zetapotentials erfolgte mit dem Zetasizer Nano ZS. Allerdings ist das hierbei zu Grunde liegende Messprinzip die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Liegt ein geladenes Partikel in Suspension vor, lagert sich eine festgebundene Schicht Gegenionen an und es wird die sogenannte Helmholtz-Schicht ausgebildet. Durch weitere Anlagerung locker gebundener Ionen entsteht die diffuse Schicht und das Partikel erscheint nach außen hin neutral. Legt man nun an die Elektroden der Küvette eine Spannung an, wandern die Partikel zu den jeweils entgegengesetzt geladenen Elektroden. Durch die Bewegung im Medium wird ein Teil der diffusen Schicht abgestreift und es entsteht eine Scherschicht. Dadurch erscheint das Partikel nicht mehr neutral, sondern besitzt nun an der Scherschichtgrenze das Zetapotential. Die Geschwindigkeit der Partikel kann über die Messung der Streuung des eingestrahnten Lichts bestimmt werden. Aus dieser wiederum lässt sich das Zetapotential mit Hilfe der Henry-Gleichung berechnen. Die tabellierten Werte ergaben sich aus Messungen von jeweils drei unabhängigen Proben und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

2.2.3 Raster-Kraft-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen der Liposomen wurden mit dem Raster-Kraft-Mikroskop JPK Instruments Nanowizzard 3 (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) erstellt. Die Oberfläche der Probe wird hierbei mit einer feinen Nadel, welche an einer Blattfeder (engl. cantilever) befestigt ist, abgetastet. Durch Höhen und Tiefen auf der Probe wird die Nadel unterschiedlich stark ausgelenkt, was wiederum zur Verbiegung des Cantilevers führt. Durch einen auf den Cantilever gerichteten Laserstrahl, dessen Reflexion von einem Photodetektor erfasst wird, kann man Rückschlüsse auf die Oberflächenstruktur der Probe ziehen. Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden 20 μ l Liposomen auf Silicium-Plättchen gegeben und getrocknet. Unter Verwendung eines 230 μ m langen Cantilevers (Resonanzfrequenz 170kHz, nominale

Kraftkonstante 40 N/m) mit einer pyramidalen Si₃N₄-Spitze (NSC 16 AIBS, Mikromasch, Tallin, Estland) fanden die Messungen im intermittierenden Modus statt. Dabei berührt die Nadel die Probe nicht dauerhaft und empfindliche Proben werden geschont. Die Messfrequenz betrug 0,5 – 1,5 Hz. Für die dargestellten Bilder wurde das Amplitudensignal und das Höhsignal aufgenommen.

2.2.4 Verkapselungseffizienz

Unter Verwendung der Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography (SEC)) kann der freie Wirkstoff von verkapseltem Wirkstoff abgetrennt werden. Die Probe wird dazu auf eine Säule, die mit einem porösen Gel gefüllt ist, aufgebracht. Dabei verteilt sich der Wirkstoff aufgrund seiner Größe in den Poren des Gels und wird sehr langsam eluiert. Liposomen hingegen, deren Größe sich oberhalb des Ausschlussvolumens befindet, werden mit dem Elutionsmittel eluiert, da sie sich nicht in den Poren festsetzen können. Da Liposomen auf der Säule spreiten, musste vor der Auftrennung die Säule mit Leerliposomen gesättigt werden, um einen Verlust an Lipiden zu vermeiden. Die Proben wurden auf Sephadex G-25 Säulen (PD-10 Columns, GE Healthcare, Deutschland) aufgebracht. Als mobile Phase diente PBS-Puffer und das Probenaufgabevolumen betrug immer 1 ml Liposomen. Nachdem das Volumen der liposomalen Fraktion bestimmt wurde konnten 50 µl davon für die Gehaltsbestimmung in Methanol verdünnt werden. Mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers mit einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (FLUOstar, Optima, BMG, Deutschland) konnten die Proben vermessen werden. Die Menge an verkapseltem Hypericin in der jeweiligen Probe errechnete sich aus der Kalibriergeraden der Stammlösung. Anschließend wurde die Verkapselungseffizienz (VE) nach folgender Gleichung berechnet:

$$VE = \frac{\text{Hypericin verkapselt}}{\text{bei Herstellung zugefügtes Hypericin}} * 100$$

2.2.5 Lagerstabilität

Damit der Einfluss des HP β CD auf die Stabilität der Liposomen untersucht werden konnte, wurden erneut Zetasizer Messungen nach 7 und 21 Tagen Lagerung durchgeführt. Die Lagertemperatur betrug 4 °C. Der hydrodynamische Durchmesser, der PDI und das Zetapotential sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

2.2.6 Stabilität in IMDM oder FKS 60%

Da die Inkubationszeit der Liposomen auf den Zellen für die Bestrahlungsexperimente einige Stunden beträgt, muss deren Stabilität in Zellkulturmedium untersucht werden. Die Stabilität der konventionellen Liposomen, für die antibakterielle Therapie sollte in 60% FKS getestet werden. Dafür wurden 100 μ l Liposomen mit 900 μ l IMDM, welches 10% FKS enthielt oder mit 900 μ l 60% FKS, bei 37 °C inkubiert. Direkt nach der Herstellung sowie nach 1 h und 24 h erfolgte jeweils eine Probenentnahme von 100 μ l, welche mit 900 μ l Milli-Q-Wasser verdünnt und am Zetasizer vermessen wurde. Der hydrodynamische Durchmesser, der PDI und das Zetapotential sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

2.3 Charakterisierung der Hypericinbeschichtungen

2.3.1 Mikroskopie

Die qualitative Beschaffenheit der verschiedenen Schichten und Filme wurde mikroskopisch untersucht. Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops JEOL JSM 7500F (Sollentuna, Schweden) konnten die verschiedenen Schichten bei einer angelegten Spannung von 5 kV visualisiert werden. Alle Proben wurden mit dem Gatan Alto 2500 Sputter Coater (Pleasanton, Kalifornien, USA) mit einem 2 bis 5 nm dicken Platin Film überzogen. Dieser Vorgang geschah unter Argon Schutzatmosphäre und Vakuum mit 10 mA für 120 s. Da Liposomen dem Elektronenstrahl nicht standhalten würden, wurden die liposomalen Filme mit dem Rasterkraft-Mikroskop charakterisiert. Dabei kam ein mit Aluminium beschichteter Silikon Cantilever (HQ:NSC16/AL BS, Mikromasch, USA) zum Einsatz. Die Messungen fanden im intermittierenden Modus mit einer Messfrequenz von 0,5 - 1 Hz statt.

2.3.2 Gehaltsbestimmung des Hypericins

PUR Plättchen mit einer definierten Größe von 0,25 cm² wurden mit den drei verschiedenen Filmen, wie unter 2.1.4 beschrieben, überzogen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Plättchen in jeweils 300 µl Methanol auf einem Schüttler. Die Menge an gelöstem Hypericin konnte über die Fluoreszenzintensität (wie in 2.2.4) bestimmt werden. Der Berechnung lag eine Kalibriergerade von Hypericin in Methanol zu Grunde. Die Konzentration wurde für jede Beschichtung dreimal an jeweils unabhängigen Proben bestimmt.

2.4 In vitro Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität der Liposomen

2.4.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Die Lagerung der grampositiven Kokken *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* (DSM 18669) und der gramnegativen Bazillen *Escherichia coli* DH5α erfolgte bei -80 °C in Müller-Hinton-Bouillon (MHB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), welches 20% Glycerol enthielt. Die Bakterien wurden über Nacht in 5 ml MHB bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend konnte eine Tageskultur mit einer optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) von 0,05 nach folgender Berechnung hergestellt werden.

$$V(NK) = \frac{OD(SOLL)}{OD(NK)} * V(M)$$

mit V(NK) dem Volumen der Übernachtskultur mit ihrer spezifischen OD (NK) das in V(M) das vorgelegte Volumen frischen Mediums pipettiert werden muss, um eine gewünschte OD(SOLL) von 0,05 zu erhalten. Gemessen wurde die OD mit einem UV Mini 1240 (Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Die Versuchsdurchführung erfolgte mit Kulturen, die eine OD₆₀₀ von 0,55 erreicht hatten, was einer Zelldichte von 10⁸ CFU/ml (colony forming units/ml oder Koloniebildende Einheiten/ml) entspricht. Durch Autoklavieren der Verbrauchs- und Arbeitsmaterialien konnten aseptische Arbeitsbedingungen sichergestellt werden.

2.4.2 Photodynamische Therapie an Suspensionskulturen

Die photodynamische Aktivität der Liposomen sollte nach einem bereits beschriebenen Versuchsablauf an Suspensionskulturen getestet werden [83]. Dazu wurden 100 µl der Bakterienkultur, 100 µl Liposomen und 100 µl MHB in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 min oder 2 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Endkonzentrationen an Hypericin pro Reaktionsgefäß betrugen 10 und 20 µM für Liposomen, die nach der Filmmethode hergestellt wurden, und 2,5 und 5 µM für DRV-Liposomen. Nach dem Überführen von jeweils 100 µl der Proben in eine 48-Well-Platte konnte jedes Well mit einem 100 mW Laser mit einer Wellenlänge von 589 nm (Weber Medical GmbH, Lauenförde, Deutschland) für 6 min bestrahlt werden. Dies resultierte in einer Fluenz von 22,2 J/cm² pro Well. Danach wurde für jede Probe eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt und jede Verdünnung dreifach auf Agarplatten ausgestrichen. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C konnten die CFU/ml ausgezählt und nach folgender Formel berechnet werden.

$$\frac{CFU}{ml} = \frac{CFU}{Platte} * 10 * 10^{Verdünnungsschritt}$$

Als Kontrollgruppen dienten bestrahlte und unbestrahlte Bakterien, die nur mit Medium oder leeren Liposomen inkubiert wurden und unbestrahlte Bakterien, die mit Hypericin-Liposomen inkubiert wurden (Darkkontrolle). Die Ausführung des Experiments erfolgte jeweils dreimal.

2.4.3 Bindung von Hypericin an die Bakterienmembran

2.4.3.1 Konfokalmikroskopie

Unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie (engl. Confocal Laser Scanning Microscopy/CLSM) sollte die Bindung des Hypericins an die Bakterienmembran qualitativ nachgewiesen werden. Dafür wurde eine Bakterienkultur mit einer Zelldichte von 10⁸ Zellen bei 5000 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift erfolgte dreimal. Nach 30-minütiger Inkubation der Bakterien mit 10 µM Hypericin-Liposomen folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS-Puffer. Nach dem Anfärben der Bakterien mit SYTO-9® (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) für 15 min konnte die Bakteriensuspension auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas fixiert werden. Ein Zeiss 700 Konfokalmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) stand für die

mikroskopischen Aufnahmen zur Verfügung. SYTO-9® wurde mit einem 488 nm und Hypericin mit einem 555 nm Diodenlaser angeregt.

2.4.3.2 Bindungsassay

Um die Bindung von Hypericin an die Bakterienmembran quantitativ nachzuweisen, wurde eine Tageskultur mit einer Zelldichte von 10^8 CFU/ml bei 5000 g für 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet anschließend in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift erfolgte dreimal. Nach der Zugabe von Hypericin-Liposomen zu 1 ml Bakterienkultur erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C auf einem Schüttler. Die Endkonzentration pro Reaktionsgefäß betrug 10 µM. Anschließend wurden die Bakterien erneut mit PBS gewaschen. Nach einer 14-stündigen Inkubation des Pellet in 2% SDS waren die Bakterienzellen lysiert und die Hypericinkonzentration konnte fluorimetrisch bestimmt werden [52]. Als Kalibriergerade diente Hypericin in 2% SDS. Das Experiment wurde für jede Formulierung dreimal durchgeführt.

2.5 Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität im Hühnerembryomodel

2.5.1 In vitro Modell

Die Hypericin-Liposomen, welche das beste *in vitro* Ergebnis erreichten, sollten weiter im Hühnerembryomodel getestet werden. Dafür wurden die Eier wie unter 2.9.1 beschrieben vorbereitet, um die Chorioallantoismembran (CAM) freizulegen. An „Embryo development day“ 12 (EDD 12) konnte mit Hilfe einer Taschenlampe ein Punkt seitlich des Eis, der nicht auf der Höhe von Blutgefäßen lag, markiert werden. Mit Hilfe eines Proxxonbohrers wurde genau auf diesem Punkt ein Loch gebohrt. Nach dem Abschneiden des Luer Lock Anschlusses von einem Venofix Venenpunktionsbesteck (23 G) waren noch ca. 2 cm des Schlauchs am Anschluss vorhanden. Unter Verwendung einer Vasofix Kanüle (17 G), auf die der Luer Lock Anschluss gesteckt wurde, konnten die Membranen, die sich hinter dem gebohrten Loch befanden, durchstochen werden. Das Schlauchende an den Luer-Lock Anschlüssen konnte in das Ei eingebracht werden, sodass es in den Allantoissack ragte (Abb. 14A). Die Kanüle wurde anschließend wieder entfernt. Nachdem der Luer-Lock Anschluss am Ei platziert war, konnte das Loch mit mikrokristallinem Paraffin abgedichtet werden. Es folgte die weitere Inkubation des Eis im Brutschrank.

2.5.2 Versuchsablauf

Von jedem Ei wurde 100 µl Allantois entnommen und auf Agarplatten kultiviert. Dies diente als Nachweis für die Sterilität der Eier vor Versuchsbeginn. Anschließend wurden 100 µl einer 1:100 in PBS verdünnten Übernachtskultur von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* in den Allantoissack injiziert. Nach dreistündiger Inkubation erfolgte die Injektion von Hyp-HPβCD oder DSPC-Hyp-HPβCD. Jedes Ei erhielt so eine Gesamtkonzentration von 55,5 µg Hypericin, welche 30 min inkubiert wurde. Anschließend folgte die 10-minütige Bestrahlung des Eis mit einem 589 nm Diodenlaser bei 100% Leistung unter Verwendung eines Lichtleiters, der auf einen Luer Lock Anschluss geschraubt werden kann (Abb. 14B). Vor und nach der Bestrahlung erfolgte die Probennahme von Allantois-Flüssigkeit und Blut. Die Anzahl der Bakterien in den jeweiligen Proben wurde, wie in Punkt 2.4.2 beschrieben, durch Auszählen der CFU/ml bestimmt. Eier, die keine Injektion oder nur eine Bakterieninjektion erhalten hatten, dienten jeweils bestrahlt und unbestrahlt als Kontrollgruppen. Auch die Dark-Toxizität der Hypericinformulierungen wurde überprüft. Insgesamt fand für jede Kombination eine Sechsfachbestimmung statt.

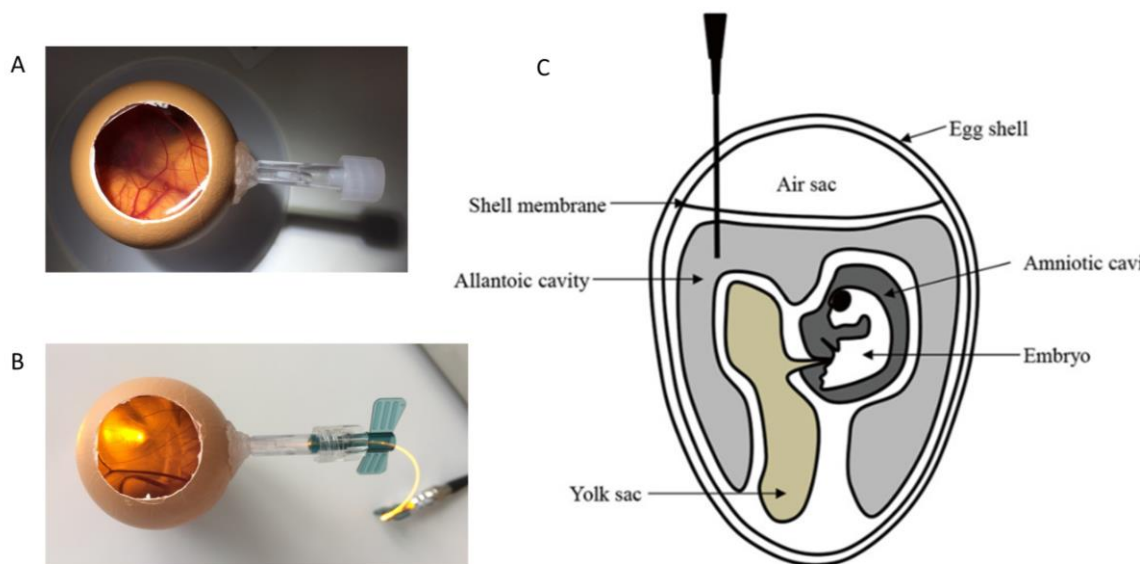


Abbildung 14: (A) Fertig präpariertes Ei vor der Bakterieninjektion (B) und während Bestrahlung. (C) Aufbau eines befruchteten Eis, mit Allantoissack, in den die Bakterien injiziert wurden [84]

2.6 Photodynamische Therapie von Biofilmen

2.6.1 Biofilm Kultivierung

Die Kultivierung der Biofilme erfolgte, indem eine Übernachtskultur von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* 1:100 mit MHB verdünnt wurde. Anschließend konnten Aliquote der verdünnten Bakteriensuspension entweder in eine 48-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) oder in PUR Röhrchen, welche an beiden Enden mit Parafilm verschlossen waren, überführt werden. Danach folgte die Inkubation der Wellplatten oder Röhrchen für 48 h bei 37 °C.

2.6.2 Charakterisierung des Biofilmwachstums

Das Biofilmwachstum konnte mit Hilfe einer spektroskopischen Methode unter Verwendung der Stephanovic Klassifizierung evaluiert werden (Tab. 1) [85]. Nach dem Verdünnen einer Übernachtskultur mit MHB in einem Verhältnis von 1:100 wurden 200 µl Aliquote in eine 96-Well-Platte (Nunclon Delta 96 Well plates, Thermo Scientific, Dänemark) überführt. Wells, die nur Medium enthielten dienten als Negativkontrolle. Die Platte wurde für 24 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend sorgte das gründliche Waschen der Biofilme mit PBS-Puffer für das Entfernen nicht adhärenter Bakterien. Dem Fixieren der Bakterien mit 99% Methanol für 15 min folgte ein Färbeschritt mit 2% Hucker-Kristallviolett-Lösung für 5 min. Das getrocknete Kristallviolett konnte in 160 µl 33%igem Eisessig gelöst und bei 570 nm in einem Spektrophotometer vermessen werden. Insgesamt wurde der Test dreimal wiederholt. Die Cut-off OD (OD_c) ist definiert als Mittelwert der Negativkontrolle plus drei Standardabweichungen. Unterhalb der OD_c sind die Bakterien nicht adhärent, also auch nicht nachzuweisen. Weiterhin werden Bakterienstämme wie folgt eingeordnet:

Tabelle 1: Biofilm Klassifizierung nach Stephanovic

OD ≤ OD_c	nicht adhärent
OD_c < OD ≤ 2 x OD_c	schwach adhärent
2 x OD_c < OD ≤ 4 x OD_c	moderat adhärent
4 x OD_c < OD	stark adhärent

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Biofilmwachstum mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops JEOL JSM 7500F (JEOL Germany GmbH, Freising, Deutschland) bei einer angelegten Spannung von 5 kV abgebildet. Das Sputtern der Proben erfolgte mit Hilfe des Gatan Alto 2500 Coaters unter Vakuum in Argonatmosphäre für 120 s bei 10 mA. So konnte ein dünner Platinfilm (2-5 nm) auf der Probenoberfläche gebildet werden.

2.6.3 Photodynamische Therapie von Biofilmen mit Liposomen

Für die Untersuchung der photodynamischen Aktivität von Liposomen auf Biofilmen wurden diese wie in 2.6.1 beschrieben kultiviert und anschließend dreimal sorgfältig mit PBS-Puffer gewaschen. Nach einstündiger Behandlung der Biofilme mit 40 μ M Hyp-HP β CD oder 40 μ M Hyp-HP β CD Liposomen bei 37 °C konnten die Hypericinformulierungen durch 500 μ l PBS ersetzt werden. Die Bestrahlung erfolgte anschließend mit einem 589 nm Diodenlaser mit 50 mW (Weber Medical GmbH, Lauenförde, Deutschland) (Abb. 15). Dabei wurde jedes Well der 48-Well-Platte mit einer Fluenz von 40 J/cm² bestrahlt. Ein Lichtleiter (Weber Medical GmbH, Lauenförde, Deutschland) ermöglichte die Bestrahlung der PUR Röhrchen mit einer Fluenz von 9,2 J/cm². Um die Biofilme von dem jeweiligen Substrat abzulösen, wurden diese 20 min mit 5 mg/ml Trypsin Lösung bei 37 °C inkubiert und danach mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der CFU/ml, wie in 2.4.2 beschrieben. Die Kontrollgruppen bestanden aus bestrahlten und unbestrahlten Biofilmen, die entweder mit Medium oder leeren Liposomen inkubiert wurden. Unbestrahlte, mit Hypericinformulierungen behandelte Biofilme dienten als Darkkontrolle. Es fand eine Dreifachbestimmung statt.

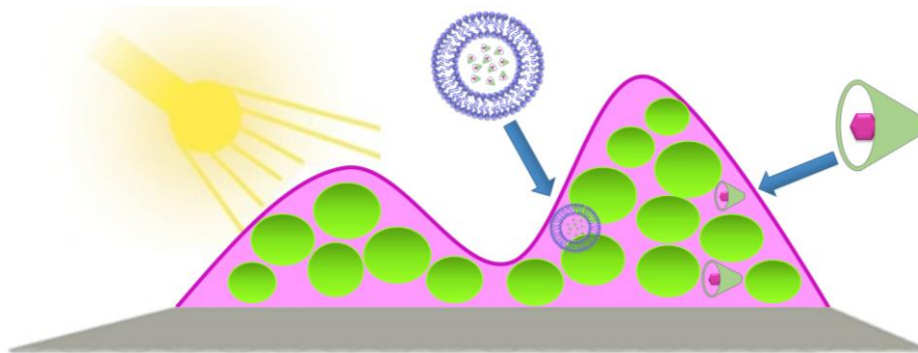


Abbildung 15: Photodynamische Behandlung von Biofilmen auf PUR oder 48-Well-Platten mit liposomalen Formulierungen oder Hyp-HP β CD von außen

2.6.4 Photodynamische in vitro Aktivierung der Hypericinbeschichtungen in Kombination mit Ultraschall

Die photodynamische Aktivität der Hypericinformulierungen gegen Biofilme soll nun aus einer anderen Perspektive untersucht werden. Auf den oberflächenmodifizierten PUR Röhrchen wurde ein Biofilm gezüchtet wie in 2.6.1 beschrieben. Nach einem gründlichen Waschschrift mit PBS konnte die eine Gruppe der Röhrchen bestrahlt werden, wie in 2.6.3 beschrieben (Abb. 16). Eine zweite Gruppe erhielt eine Behandlung mit Ultraschall vor der Bestrahlung. Dafür wurde das Röhrchen in einem Wasserbad fixiert und mit einer Ultraschallspitze (Sonoplus, BANDELIN, Berlin, Deutschland) in einem Abstand von 3 cm beschallt. Mit einer Frequenz von 20 kHz, einer 30% Amplitude und einem gepulsten Ultraschall von 0,1 sec über 1 sec, konnte eine Energie von 0,515 kJ erzeugt werden. Die Bestimmung der CFU/ml erfolgte wie bereits dokumentiert. Als Kontrollgruppen dienten wieder unbestrahlte Proben.

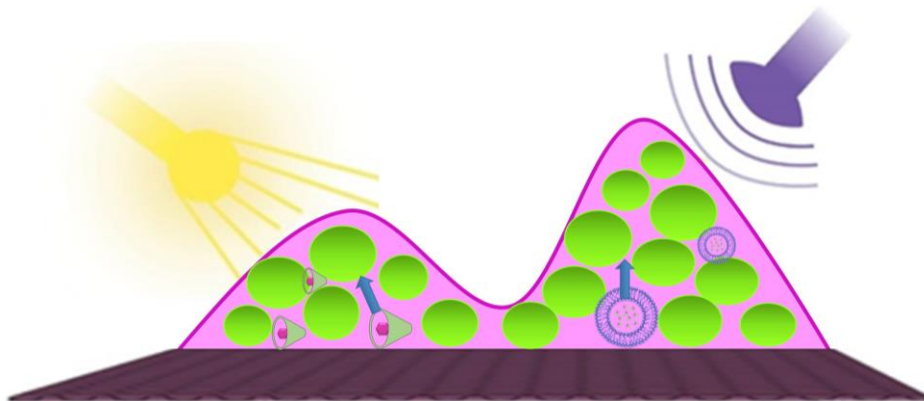


Abbildung 16: Photodynamische Behandlung von Biofilmen, die auf mit Hypericinformulierungen beschichteten PUR-Oberflächen gewachsen sind, unter zusätzlicher Anwendung von Ultraschall

2.6.5 Visualisierung der Biofilminaktivierung

Der Unterschied in der Viabilität der Bakterien und der Biofilmstruktur vor und nach Behandlung mit Hyp-HP β CD wurde jeweils mit Hilfe der Konfokalmikroskopie oder der Rasterelektronenmikroskopie dargestellt. Dafür erfolgte die Züchtung von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* Biofilmen auf unbehandelten und auf mit PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD modifizierten PUR-Plättchen, wie bereits unter 2.6.1 beschrieben. Nach dem Waschen der Biofilme mit PBS-Puffer, konnten die Plättchen mit dem LIVE/DEAD BacLight Kit® (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert werden.

Dieser besteht aus dem grün fluoreszierenden Farbstoff SYTO-9®, welcher durch die Zellwand lebender und toter Zellen penetrieren kann, und dem rot fluoreszierenden Farbstoff Propidiumiodid, der nur geschädigte Zellmembranen durchdringen kann. In Anwesenheit von Propidiumiodid reduziert sich die Fluoreszenz von SYTO-9®, so dass lebende Bakterien grün und tote Bakterien rot erscheinen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Zeiss 700 Konfokalmikroskops (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt. Für die elektronenmikroskopischen Bilder zur Untersuchung der Biofilmstruktur vor und nach Bestrahlung mussten die Proben, wie in 2.6.2. beschrieben, vorbereitet und vermessen werden.

2.7 *In vitro* Untersuchung der photodynamischen Aktivität auf SK-OV-3 Zellen

2.7.1 *Kultivierung der Zellen*

SK-OV-3 Zellen (humane Adenokarzinomzellen des Ovars, ATCC, Virginia, USA) wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 7% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% inkubiert. Als Nährmedium für die Zellen diente IMDM (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland), welches mit 10% FKS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt wurde. Die Zellen wuchsen in Petrischalen (ø 10cm) und es erfolgte eine Subkultivierung, sobald sie eine Konfluenz von 80% erreicht hatten.

2.7.2 *Zytotoxizität*

Mit Hilfe des MTT-Assays ist es möglich, die Phototoxizität der Hypericin-Liposomen auf SK-OV-3 Zellen zu untersuchen. Das wasserlösliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird hierbei von stoffwechselaktiven Zellen durch NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen zu unlöslichen, lilafarbenen Formazankristallen reduziert [86]. Diese können nach Auflösen in DMSO bei 570 nm photometrisch vermessen werden. Dabei ist die gemessene Absorption proportional zur Zellviabilität. 24 h vor dem Versuch wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte (NUNC, Thermo Scientific, Deutschland) ausgesät. Nach Inkubation der Zellen mit Hypericin-Liposomen verschiedener Konzentration für jeweils 1, 2 oder 4 h konnten die Liposomen durch IMDM Medium ersetzt werden. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit einer speziell angefertigten LED-Lampe bei einer Wellenlänge von

587 nm (Lumundus, Eisenach, Deutschland) mit verschiedenen Bestrahlungsintensitäten von 2,1, 4,1, 8,3 und 12,4 J/cm². Im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C konnte das Medium abgesaugt und durch MTT ersetzt werden. Eine weitere Inkubationszeit von 4 h führte zur Reduktion des lichtempfindlichen MTTs durch stoffwechselaktive Zellen. Die Formazankristalle wurden mit DMSO gelöst und mit dem Mikroplatten-Lesegerät vermessen (FLUOstar Optima, BMG, Deutschland). Unbehandelte Zellen repräsentieren 100% Zellviabilität. Der Absorptionswert pro Konzentration errechnete sich aus dem Mittelwert von drei Wells. Als Kontrolle dienten leere Liposomen mit und ohne Bestrahlung sowie Hypericin-Liposomen ohne Bestrahlung (Darkkontrolle).

2.7.3 Aufnahme von Hypericin in die Zellen

Konfokale Mikroskopie wurde genutzt, um die Aufnahme von Hypericin in SK-OV-3 Zellen qualitativ darzustellen. Nach der Aussaat von 9×10^4 Zellen/Well in eine 12-Well-Platte mit Deckgläschen (15 mm Durchmesser) mussten die SK-OV-3 Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 4 h mit Hypericinformulierungen einer Konzentration von 1 µM behandelt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ (pH 7,4). Danach mussten die Zellen 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert werden, bevor sie nach einem erneuten Waschschrift mit DAPI (0,1 µg/ml) angefärbt werden konnten. Das überschüssige DAPI wurde mit PBS-Puffer mit Ca²⁺/Mg²⁺ abgewaschen und die Deckgläschen auf Objektträger gelegt. FluorSave™ (Calbiochem Corp, La Jolla, USA) diente zur Fixierung der Deckgläschen. Die Proben wurden mit einem Carl Zeiss 700 Konfokalmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der 405 und 555 nm Laser (jeweils für DAPI und Hypericin) untersucht.

2.7.4 Charakterisierung des endozytotischen Aufnahmemechanismus

Der Aufnahmeweg in die Zellen konnte genauer untersucht werden, indem die Caveolae-vermittelte Endozytose durch Filipin III und die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Chlorpromazin blockiert wurde. Anschließend konnte die Wirkung der Liposomen auf Zellen, die mit Inhibitoren vorbehandelt waren, mit der Wirkung auf unbehandelten Zellen verglichen werden. SK-OV-3 Zellen wurden in 96-Well-Platten mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und 24 h bei 37 °C belassen. Am nächsten Tag mussten die Zellen mit PBS-Puffer mit

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen werden, um Serumreste zu entfernen, welche die Wirkung der Inhibitoren beeinflussen könnten. Nach der Präinkubation mit Filipin III (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Chlorpromazin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für jeweils 60 min erfolgte die Behandlung der Zellen mit Hypericin-Liposomen der Konzentration 250 nM für 3 h. Nachdem die Liposomen durch frisches Medium ausgetauscht wurden, fand die Bestrahlung der Zellen mit einer Fluenz von 8,3 J/cm^2 statt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag die Zellviabilität mittels MTT-Assay, wie bereits in 2.7.2 beschrieben, bestimmt. Eine unbestrahlte Platte diente als Kontrolle, um sicherzustellen, dass die Inhibitoren keine toxische Wirkung auf die Zellen zeigten.

2.8 Biokompatibilität

2.8.1 *Ex-vivo Hämolyse Assay*

Um das hämolytische Potential der Liposomen zu untersuchen, wurden Erythrozyten aus menschlichem Blut isoliert. Das frische Blut befand sich in einem Röhrchen, welches EDTA enthielt. Nach dem Zentrifugieren des Röhrchens bei 500 g für 20 min entstand ein Pellet aus roten Blutzellen, welches dreimal mit 0,9% NaCl (pH 7,4) gewaschen wurde. Eine 1:50 Verdünnung der Erythrozyten in 0,9% NaCl konnte nun zusammen mit den Liposomen für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler in Mikrotiterplatten mit v-förmigem Boden inkubiert werden. Die Platten wurden zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 540 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Fluostar Optima, BMG, Deutschland) bestimmt. PBS-Puffer und 1% Triton X-100® dienten als Kontrolle. Die Absorptionswerte von Triton X-100® wurden mit 100% Hämolyse gleichgesetzt.

2.8.2 *Aktivierte partielle Thromboplastinzeit*

Der aktivierte partielle Thromboplastinzeittest (aPTT) sollte Aufschluss über den Einfluss der liposomalen Formulierungen auf die Blutgerinnung geben. Frisches Blut, welches sich in Röhrchen befand, die Natriumcitrat enthielten, wurden bei 1000 g für 10 min zentrifugiert, um die Plasmafraktion abzutrennen. Der aPTT Test konnte mit Hilfe des Coatron M1 coagulation analyzer (Teco, Neufahrn, Deutschland) unter Verwendung des TEClot aPTT-S Kit durchgeführt werden. Dabei mussten 25 μl des Plasmas mit 25 μl der zu untersuchenden Probe gemischt werden. Nach Zugabe von 50 μl des aPTT Reagenzes, um die

Koagulationsfaktoren zu aktivieren, erfolgte der Zusatz von 50 µl bereits vorgewärmten Calciumchlorid. Der Koagulationszeitpunkt wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Zeit in Sekunden aufgezeichnet.

2.9 *In vitro* Untersuchung der photodynamischen Aktivität im Chorioallantois-Membran-Modell

2.9.1 *Chorioallantois-Membran-Modell*

Die in dieser Arbeit verwendeten befruchteten Hühnereier wurden bei Brormann GmbH (Rheda-Wiedenbrück, Deutschland) bestellt. Nach dem Eintreffen mussten die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert und in einem speziellen Inkubator, der mit einem automatischen Drehwerk ausgestattet war (Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland), bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% bebrütet werden. Das Chorioallantois-Membran-Modell (CAM) wurde nach einer bereits beschriebenen Methode, mit leichten Änderungen, vorbereitet [87]. Mit Hilfe eines druckluftbetätigten EggPunch (Schuett-Biotec, Deutschland) konnten die Eier an "Embryo development day" 4 (EDD 4) an der stumpfen Seite eingestantzt werden. Nach dem Entfernen der Eierschale entlang der Bruchstelle, war ein Teil der CAM in einem Ausschnitt von 30 mm offengelegt. Das Loch wurde mit einer sterilen 50 mm Petrischale abgedeckt, um Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die weitere stationäre Inkubation der Eier bis EDD 12.

2.9.2 *Versuchsdurchführung*

Liposomen, die 100 µM Hypericin enthielten, wurden in einem Volumen von 100 µl intravenös in die CAM injiziert. Ein kleiner Polypropylenring markierte die Stelle der CAM-Oberfläche, an der später die Laser-Behandlung stattfinden sollte. Nach 7-minütiger Inkubation der Liposomen erfolgte die Bestrahlung mit dem Weber Laser der Wellenlänge 589 nm mit einer Fluenz von 11,4 J/cm². Mikroskopische Bilder der CAM wurden vor, direkt nach und 60 min nach der Bestrahlung mit einem Stemi 2000-C Stereo Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), das mit einer Moticam 5 CMOS Kamera (Motic Deutschland, Wetzlar, Deutschland) ausgestattet war, gemacht. Die Daten für jede liposomale Formulierung ergaben sich aus einer Dreifachbestimmung. Eier, die mit PBS behandelt wurden, dienten als Negativ-

Kontrolle. Der Behandlungseffekt konnte in verschiedene Level eingeteilt werden, die das Ausmaß der Gefäßschädigung beschreiben (Tab. 2) [88].

Tabelle 2: Einteilung der verschiedenen Behandlungslevel

Behandlungslevel	Kriterien
0	Kein Effekt
1	teilweise Verschluss von Kapillaren ($\varnothing < 10 \mu\text{m}$)
2	Verschluss von Kapillaren, teilweise Verschluss von Blutgefäßen ($\varnothing < 30 \mu\text{m}$)
3	Verschluss von Gefäßen ($\varnothing < 30 \mu\text{m}$), teilweise Verschluss von größeren Gefäßen
4	Totaler Verschluss von Gefäßen ($\varnothing < 70 \mu\text{m}$), teilweise Verschluss von größeren Gefäßen
5	Totaler Verschluss des bestrahlten Bereichs

3 Herstellung und Charakterisierung von Hypericin-Liposomen – Ergebnisse und Diskussion

Werden Liposomen systemisch verabreicht, ist die Größe ein bedeutender Einflussfaktor für die Pharmakokinetik der Arzneistoffträger. Mit Verringerung der Liposomengröße nimmt auch die Anlagerung von Proteinen ab und somit die Aufnahme durch das RES [89]. Des Weiteren kann der „enhanced permeability and retention“ (EPR) Effekt des Tumorgewebes besser von Liposomen in einem Größenbereich von 100-200 nm ausgenutzt werden. Dabei handelt es sich um die passive Akkumulation von Molekülen größerer Molmasse im Tumorgewebe, welche durch die erhöhte Permeabilität des Kapillarendothels und des gering ausgeprägten Lymphsystems bedingt ist [90]. Auch Liposomen, welche erfolgreich die Aufnahme und Wirkung von Antibiotika in Bakterien und Biofilmen verbesserten, bewegen sich in einem Größenbereich deutlich unter 500 nm [91].

3.1 Dynamische Lichtstreuung und Laser-Doppler-Anemometrie

Der hydrodynamische Durchmesser, der PDI und das Zetapotential wurden, wie unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, mit dem Zetasizer Nano ZS bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Zuerst sollen die Liposomen beschrieben werden, bei welchen Hypericin mit Hilfe der Filmmethode in der Lipiddoppelschicht verkapselt wurde. Die Lipidmischungen DOPE/CHEMS/DPPC, DSPC/DPPC/DSPE-PEG und DPPC/TEL ergaben dabei Vesikel in einem ähnlichen Größenbereich von jeweils 127 ± 12 , 126 ± 19 und 127 ± 14 nm, während DPPC/DOTAP und DSPC Liposomen eine Größe von jeweils 173 ± 21 nm und 150 ± 11 nm zeigten. Die Literatur beschreibt für DOPE/CHEMS/DPPC und DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen eine Größe von jeweils 103 und 80 nm [67, 92]. Allerdings fand dort bei der Herstellung auch eine Extrusion der Vesikel statt. Auf diesen Schritt ist in dieser Arbeit bewusst verzichtet worden, da das Extrudieren der Liposomen zu einem erheblichen Verlust des Hypericins führte, welches in der Filtermembran des Extruders verblieb. Die Literaturdaten der Größen von DPPC/DOTAP und DSPC Liposomen stimmen mit den in dieser Arbeit gemessenen überein [78, 93]. Vergleicht man die Leerliposomen mit den Hypericin-Liposomen, so zeigt die Verkapselung des PS nur einen geringen Einfluss auf die Größe. Im Fall

von DOPE/CHEMS/DPPC, DSPC/DPPC/DSPE-PEG und DPPC/TEL nimmt die Größe leicht ab, während sie bei DSPC und DPPC/DOTAP leicht zunimmt.

Tabelle 3: Hydrodynamischer Durchmesser, Zetapotential und PDI der in dieser Arbeit verwendeten Liposomen, bestimmt mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung und der Laser-Doppler-Anemometrie (n=3, Mittelwert \pm Standardabweichung der Intensitätsauswertung)

Lipidzusammensetzung [mol%]	Größe [nm] \pm SD	Zetapotential [mV] \pm SD	PDI
Liposomen (leer)			
DOPE/CHEMS/DPPC (40/40/20)	145 \pm 18	-47 \pm 2	0,29
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (75/20/5)	139 \pm 14	-25 \pm 2	0,18
DPPC/DOTAP (95/5)	157 \pm 14	44 \pm 3	0,25
DSPC	129 \pm 15	-2 \pm 1	0,45
DPPC/TEL (90/10)	167 \pm 21	-2 \pm 1	0,30
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (80/15/5)	137 \pm 26	-27 \pm 2	0,38
Filmmethode – Hypericin verkapselt			
DOPE/CHEMS/DPPC (40/40/20)	127 \pm 12	-45 \pm 1	0,21
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (75/20/5)	126 \pm 19	-27 \pm 2	0,32
DPPC/DOTAP (95/5)	173 \pm 21	20 \pm 1	0,25
DSPC	150 \pm 11	-1 \pm 1	0,26
DPPC/TEL (90/10)	127 \pm 14	-3 \pm 1	0,24
DRV-Methode – Hyp-HPβCD verkapselt			
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (80/15/5)	198 \pm 19	-36 \pm 1	0,31
DSPC	191 \pm 16	-22 \pm 1	0,26
DPPC/TEL (90/10)	212 \pm 13	-56 \pm 1	0,29

Die PDI's der Hypericin-Liposomen, welche in einem Bereich von 0,21-0,32 liegen, deuten auf eine polydisperse Verteilung hin. Das Zetapotential der Formulierungen ist, wie zu erwarten, sehr unterschiedlich. Die DOPE/CHEMS/DPPC Liposomen zeigten das negativste Zetapotential von -45 \pm 1 mV. Ähnlich stark negative Zetapotentiale für DOPE/CHEMS Liposomen von -55 \pm 3,2 mV sind auch in der Literatur zu finden [94]. Die DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen weisen ebenfalls ein negatives Zetapotential von -27 \pm 2 mV auf, das auf die negative Ladung der Phosphatgruppen des DSPE-PEG zurückzuführen sein könnte [94].

Vesikel, welche aus dem neutralen Lipid DSPC bestehen, zeigen ein Zetapotential von -1 ± 1 mV und die DPPC/TEL Liposomen von -3 ± 1 mV. Die DPPC/DOTAP-Formulierung weist aufgrund der positiven Ladung der DOTAP-Kopfgruppe ein Zetapotential von 20 ± 1 mV auf. Im Vergleich zu den DPPC/DOTAP Leerliposomen, die ein Zetapotential von 44 ± 3 mV besitzen, ist dieses jedoch niedriger. Der Grund dafür ist die Verkapselung des Hypericin, welches aufgrund seiner vinylogenen Carbonsäure-Gruppe eine negative Nettoladung trägt und mit den positiv geladenen Kopfgruppen des DOTAP elektrostatische Wechselwirkungen eingehen kann.

Liposomen, welche nach der DRV-Methode mit Hyp-HP β CD Komplexen beladen wurden, besitzen im Vergleich zu den Leer- und Hypericin-Liposomen einen größeren hydrodynamischen Durchmesser (Abb. 17). Die DSPC Formulierung ergibt 191 ± 16 nm große Liposomen, während die Mischungen von DPPC/TEL und DSPC/DPPC/DSPE-PEG jeweils

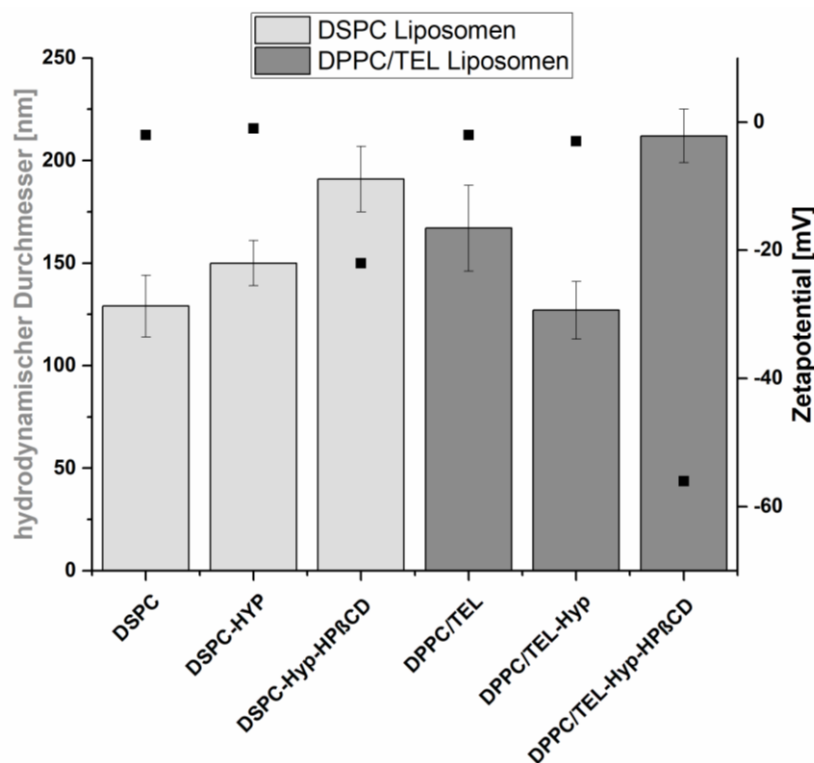


Abbildung 17: Hydrodynamischer Durchmesser und Zetapotential von DSPC und DPPC/TEL Liposomen im Vergleich: leere Liposomen (DSPC, DPPC/TEL), mit Hypericin beladene Liposomen (DSPC-Hyp, DPPC/TEL-Hyp) und mit Hyp-HP β CD beladene Liposomen (DSPC-Hyp-HP β CD, DPPC/TEL-Hyp-HP β CD) (n=3, Mittelwert \pm Standardabweichung der Intensitätsauswertung)

212 ± 13 und 198 ± 19 nm große Vesikel ergeben. Der Grund für die Größenzunahme könnte ein osmotischer Effekt sein. So kann Wasser nach dem Entfernen von freiem Hyp-HP β CD Komplex durch die Säulenchromatographie in die Liposomen eindringen, was zu einem Aufquellen der Vesikel führt [95]. Das Zetapotential der DRV-Liposomen ist wesentlich

niedriger als das ihrer leeren Pendants. Eigentlich wäre zu erwarten, dass eine Verkapselung des Wirkstoffs im wässrigen Kompartiment keinen wesentlichen Einfluss auf das Zetapotential zeigt, insbesondere da die Inkorporation von Hypericin in die Membran bei neutralen Lipidzusammensetzungen auch keinen Einfluss auf die Partikelladung hatte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass bei der Rehydrierung des Lyophilisats der Hyp-HP β CD Komplex nicht nur eingeschlossen wird, sondern auch auf der inneren und äußeren Liposomenmembran adhäriert vorliegt. Die PDI's der DRV-Liposomen liegen in einem Bereich von 0,26-0,31 und deuten somit auch auf eine polydisperse Verteilung der Vesikel hin. Eine monomodale Verteilung kann mit Hilfe der Extrusion der Liposomen durch Filtermembranen erreicht werden. Die DRV-Liposomen könnten vor der Beladung mit dem Komplex extrudiert werden, wodurch kein Wirkstoff verloren gehen würde. Da die konventionellen Liposomen nicht extrudiert waren, wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit auch hier darauf verzichtet.

3.2 Raster-Kraft-Mikroskopie

Die morphologische Darstellung der Liposomen erfolgte mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie. Abbildungen 18 und 19 zeigen runde Vesikel mit Durchmessern zwischen 85 und 200 nm. Die Durchmesser, die aus den AFM Aufnahmen erhalten wurden, korrelierten mit den Zetasizer Nano ZS Messungen aus 3.1.

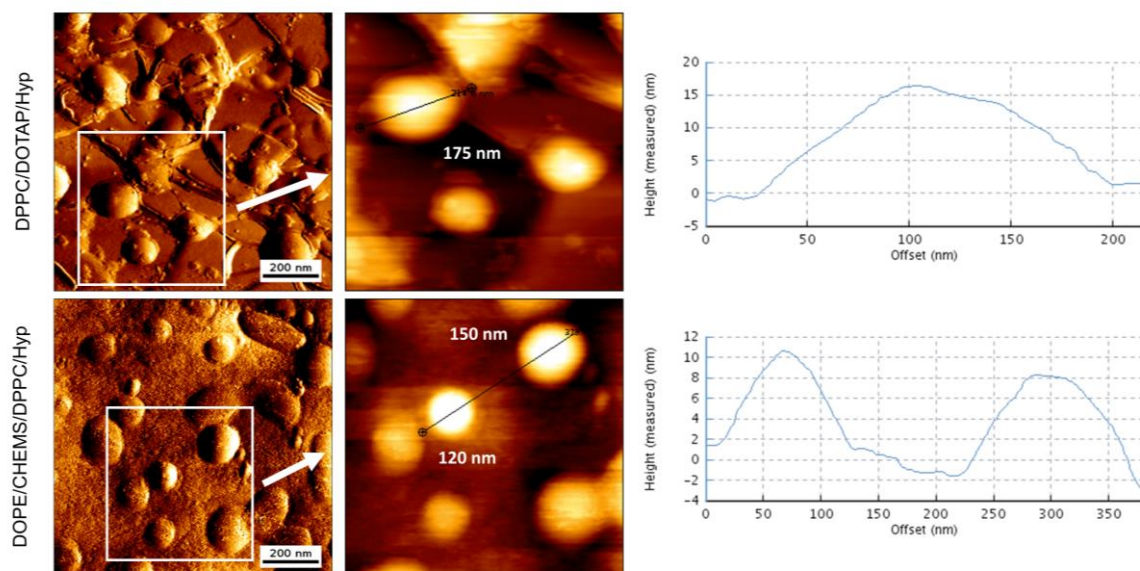


Abbildung 18: AFM-Aufnahmen der DOPE/CHEMS/DPPC und der DPPC/DOTAP Liposomen. Die linke Bilderreihe ist im amplitude mode dargestellt, während die mittlere Bilderreihe den measured height mode zeigt. Für diesen ist ein Querschnittsverlauf entlang der schwarzen Linie dargestellt

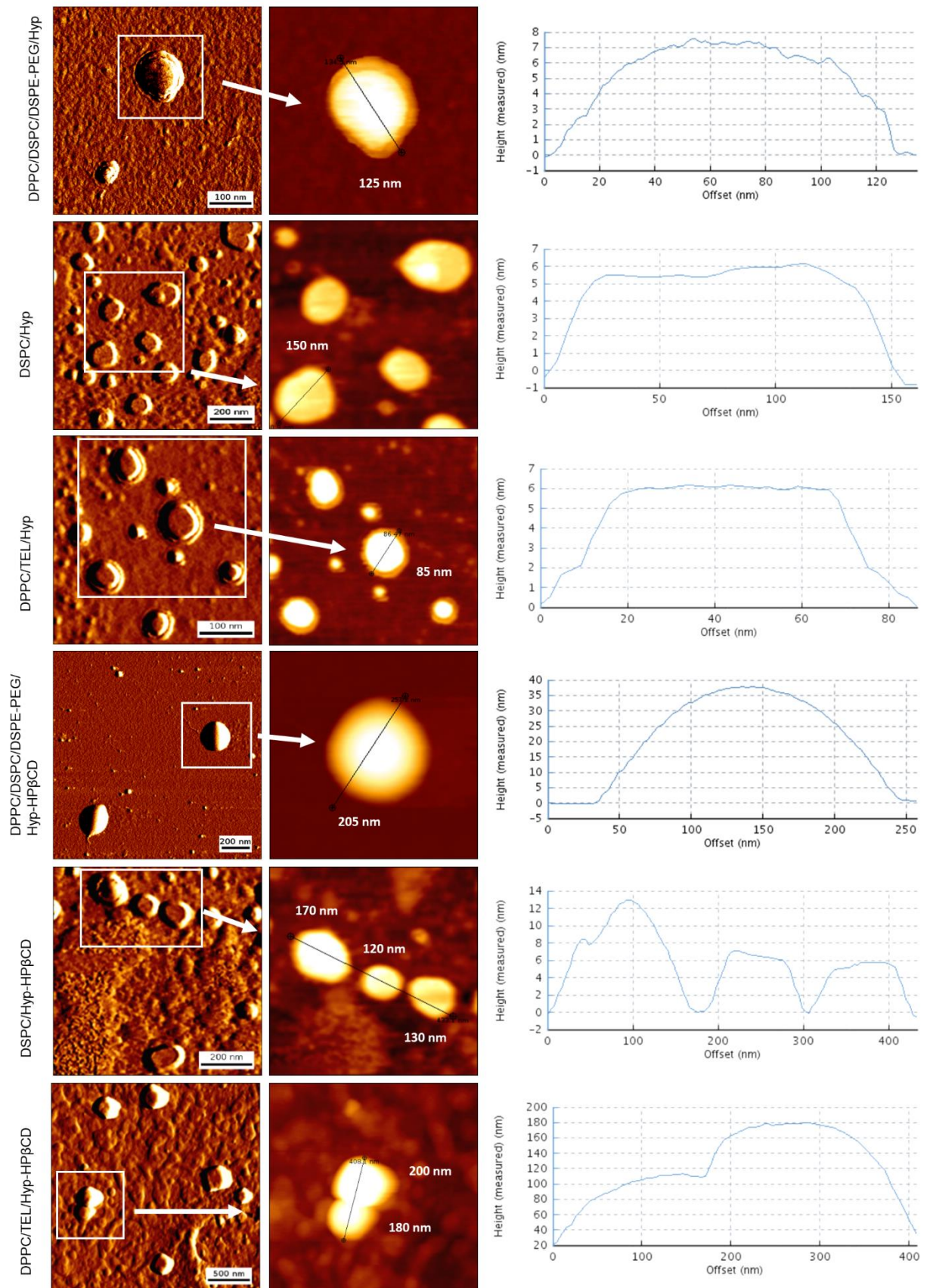


Abbildung 19: AFM-Aufnahmen der konventionellen Liposomen und der DRV Liposomen. Die linke Bilderreihe ist im amplitude mode dargestellt, während die mittlere Bilderreihe den measured height mode zeigt. Für diesen ist ein Querschnittsverlauf entlang der schwarzen Linie dargestellt

3.3 Verkapselungseffizienz

Nach dem Biopharmaceutics Classification System (BCS), das die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen anhand ihrer Wasserlöslichkeit und intestinalen Permeabilität beurteilt, fällt Hypericin in die Klasse IV [96]. Hypericin ist somit schlecht wasserlöslich und zeigt ein geringes Permeationsvermögen. Mit Hilfe der Herstellung von liposomalem Hypericin kann man dessen Löslichkeit enorm steigern und erhält somit eine Darreichungsform, die auch für die Applikation am Menschen geeignet ist. Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz gibt Aufschluss darüber, wieviel Hypericin nun in wässriger Formulierung vorliegt. Dafür wurde das Verhältnis von verkapseltem Hypericin zu dem bei der Herstellung zugegebenen Hypericin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Bei Betrachtung der Hypericin-Liposomen, welche nach der Filmmethode hergestellt wurden, wird deutlich, dass DOPE/CHEMS/DPPC-, DSPC/DPPC/DSPE-PEG- und DPPC/TEL-Liposomen gute Verkapselungseffizienzen von jeweils $91,8 \pm 2,9$, $88,9 \pm 2,8$, $82,5 \pm 2,8\%$ erzielten. DPPC/DOTAP und DSPC Liposomen verkapselten jeweils nur $64,0 \pm 4,3$ und $33,6 \pm 4,1\%$ des anfänglich hinzugesetzten Hypericins. Da Hypericin sehr lipophil ist, war zu erwarten, dass sich nach der Herstellung ein Großteil des Wirkstoffs in der Lipidmembran wiederfindet. Jedoch neigt Hypericin auch dazu, innerhalb der Lipidmembranen von Vesikeln zu aggregieren und große Cluster zu bilden [97]. Folglich könnte angenommen werden, dass Hypericinaggregate während der SEC entfernt wurden, was zu einer geringeren Verkapselungseffizienz führt. Die Literatur nennt für in verschiedene liposomale Formulierungen verkapseltes Hypericin eine Konzentration von 131 - 200 μM (66 - 110,9 $\mu\text{g/ml}$) [76]. Die in dieser Arbeit erzielten Werte von $50,5 \pm 6,2 \mu\text{g/ml}$ für DSPC und $123,8 \pm 4,2 \mu\text{g/ml}$ für DPPC/TEL Liposomen liegen somit in einem ähnlichen Bereich.

Nach Verkapselung der Hypericin-Einschlussverbindung konnten $64,8 \pm 3,9\%$ Hyp-HP β CD in DSPC und $76,3 \pm 3,4\%$ in DSPC/DPPC/DSPE-PEG wiedergefunden werden. Im Fall der DSPC Liposomen konnte somit durch die DRV-Methode die Verkapselungseffizienz fast verdoppelt werden. Die DSPC/DPPC/DSPE-PEG Formulierung zeigt eine geringere Einschlusseffizienz, verglichen mit der Formulierung, bei welcher Hypericin in der Membran sitzt. Natürlich unterscheiden sich die DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen etwas in der Lipidzusammensetzung, da für die DRV-Liposomen ein höherer DSPC Anteil gewählt wurde, um eine rigidiere Membran zu erhalten. Allerdings kann auch ein sterischer Effekt der Grund für die schlechtere Verkapselungseffizienz des Komplexes sein, da die PEG-Ketten auch Raum

im Inneren des Liposoms einnehmen können [95]. Die hohe Einschlusseffizienz von $81,6 \pm 3,2\%$ Hyp-HP β CD der DPPC/TEL Liposomen könnte auf die hohe Stabilität der liposomalen Membran und den somit geringeren Verlusten von eingeschlossenem Material zurückzuführen sein [98]. Die DRV-Liposomen liegen mit ihrer Einschlusseffizienz von $129,6 \pm 7,8 - 163,2 \pm 6,4 \mu\text{g/ml}$ über den Literaturwerten für Hypericin-Liposomen.

Tabelle 4: Verkapselungseffizienz der verschiedenen liposomalen Formulierungen

Liposomenformulierung	Theoretische Beladung [μg]	Praktische Beladung [μg]	Verkapselungseffizienz [%]
Filmmethode – Hypericin verkapselt			
DOPE/CHEMS/DPPC (40/40/20)	133,6	$122,6 \pm 3,9$	$91,8 \pm 2,9$
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (75/20/5)	133,6	$118,7 \pm 3,7$	$88,9 \pm 2,8$
DPPC/DOTAP (95/5)	133,6	$85,4 \pm 5,7$	$64,0 \pm 4,3$
DSPC	150	$50,5 \pm 6,2$	$33,6 \pm 4,1$
DPPC/TEL (90/10)	150	$123,8 \pm 4,2$	$82,5 \pm 2,8$
DRV-Methode – Hyp-HPβCD verkapselt			
DSPC/DPPC/DSPE-PEG (80/15/5)	200	$152,6 \pm 6,8$	$76,3 \pm 3,4$
DSPC	200	$129,6 \pm 7,8$	$64,8 \pm 3,9$
DPPC/TEL (90/10)	200	$163,2 \pm 6,4$	$81,6 \pm 3,2$

3.4 Lagerstabilität

Cyclodextrine sind in der Lage, Lipidmoleküle aus der Membran von Liposomen herauszulösen und diese dadurch zu destabilisieren. Inkubiert man Liposomen mit steigenden Cyclodextrinkonzentrationen, sinkt der hydrodynamische Durchmesser, bis sie sich schließlich auflösen und nur noch Mizellen und Cyclodextrin-Einschlussverbindungen vorliegen [99]. Damit ein negativer Einfluss des HP β CD auf die Liposomenintegrität ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die Vermessung von DRV-Liposomen, welche bei 4°C gelagert wurden, über einen Zeitraum von drei Wochen im Zetasizer Nano ZS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Der konstante PDI aller drei Formulierungen über drei Wochen ist ein erster Indikator für die Stabilität. Auch die Größen der DSPC- und DPPC/TEL-Liposomen schwankten nur leicht über den Zeitraum der drei Messpunkte (jeweils 191, 187, 185 nm und 212, 201, 209 nm). Lediglich der hydrodynamische Durchmesser der DSPC/DPPC/DSPE-PEG-Vesikel

nahm leicht ab von 198 auf 172 nm. Hatzi et al. fanden heraus, dass Liposomen die eine rigide Membran besitzen, Cyclodextrinmolekülen die Interaktion mit dieser erschweren [99]. Daher zeigten sich DSPC Liposomen wesentlich stabiler gegenüber HP β CD als Vesikel, die aus Lecithin bestanden. Der Zusatz von DPPC/DSPE-PEG zu DSPC macht die Membran fluider und damit eventuell auch anfälliger für das HP β CD. Die DSPC Liposomen hingegen besitzen eine rigide Membranstruktur und sind über den gesamten Messzeitraum stabil. Dies trifft auch auf die DPPC/TEL Liposomen zu, deren Membran durch die TEL-Lipide stabilisiert wird. Für die weiteren Experimente wurden Liposomen verwendet, die nicht älter als drei Wochen waren, um die Stabilität dieser zu gewährleisten.

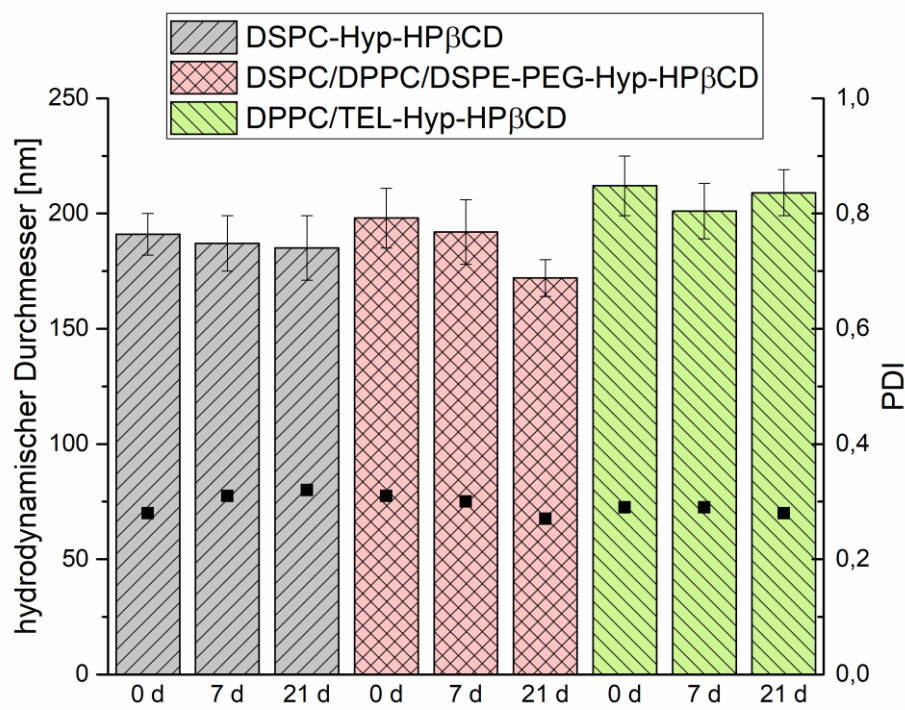


Abbildung 20: Lagerstabilität der DRV-Liposomen bei 4 °C über 3 Wochen

3.5 Stabilität in IMDM und 60% FKS

Liposomen, welche auf den SK-OV-3 Zellen *in vitro* getestet werden sollten, wurden bezüglich ihrer Stabilität in dem verwendeten Zellkulturmedium untersucht. Unter Verwendung des Zetasizer Nano ZS, konnte der hydrodynamische Durchmesser, der PDI und das Zetapotential der Vesikel entweder direkt, 1h oder 24 h nach Inkubation bei 37 °C in IMDM welches mit 10% FKS versetzt war, bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Stabilität der Liposomen in IMDM, welches mit 10% FKS versetzt wurde

Lipidzusammensetzung	Zeit [h]	Größe [nm] \pm SD	Zetapotential [mV] \pm SD	PDI
Filmmethode – Hypericin verkapselt				
DSPC-Hyp	0	297 \pm 26	-4,4 \pm 1	0,34
	1	346 \pm 10	-4,3 \pm 1	0,46
	24	239 \pm 21	-3,6 \pm 1	0,41
DPPC/TEL-Hyp	0	235 \pm 14	-8,5 \pm 1	0,35
	1	237 \pm 17	-9,2 \pm 1	0,37
	24	266 \pm 28	-10,1 \pm 1	0,53
DRV-Methode – Hyp-HPβCD verkapselt				
DSPC-Hyp-HP β CD	0	409 \pm 13	-6,5 \pm 1	0,42
	1	520 \pm 15	-7,2 \pm 1	0,48
	24	473 \pm 26	-6,8 \pm 1	0,43
DPPC/TEL-Hyp-HP β CD	0	232 \pm 31	-13,8 \pm 1	0,48
	1	204 \pm 20	-16,3 \pm 1	0,54
	24	268 \pm 36	-15,6 \pm 1	0,45

Die PDI's steigen im Vergleich zu den Messungen in PBS etwas an, bleiben jedoch in einem bestimmten Bereich konstant. Das deutet darauf hin, dass die Formulierungen in Medium generell stabil sind, die Größenverteilung allerdings etwas breiter wird. Der hydrodynamische Durchmesser der DSPC-Hyp und der DPPC/TEL-Hyp Liposomen nahm um jeweils durchschnittlich 89 und 139 nm zu, während sich der Durchmesser der DSPC-Hyp-HP β CD und der DPPC/TEL-Hyp-HP β CD Vesikel um jeweils 282 und 56 nm vergrößerte. Dieses Phänomen kann durch die Entstehung einer Proteinhülle, der sogenannten Corona, um die Liposomen erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen, welche aus verschiedenen Lipidkombinationen bestanden, nach Inkubation in menschlichem Plasma einen zwischen 12 und 138 nm größeren hydrodynamischen Durchmesser zeigten als zuvor [100]. Außerdem nahm das Zetapotential der Liposomen, welche den Hyp- HP β CD Komplex verkapselten, im Vergleich zu den in Puffer gemessenen Werten ab. Diese Normalisierung des Zetapotentials ist ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein einer Proteincorona. Liposomen mit geladener Membranoberfläche adsorbieren mehr Proteine als neutrale Vesikel. Jedoch ist die

Oberflächenladung nicht das einzige Kriterium für die Bildung einer Corona. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Interaktion zwischen den Proteinen und den funktionellen Gruppen der Lipide [101]. Vergleicht man die Zetapotentialveränderungen der konventionellen Liposomen, so scheint es, dass DPPC/TEL-Hyp Liposomen mehr Proteine binden als ihre DSPC-Pendants. Die Adsorption von Proteinen kann, neben anderen Faktoren, die Zirkulationszeit von Liposomen beeinflussen. So beschleunigen Opsonine wie Komplementfaktoren, Fibrinogen und IgG die Phagozytose von Liposomen, während Dysopsonine wie Albumin oder Apolipoproteine diese verhindern und somit die Zirkulationszeit verlängern [102]. Da die Eigenschaften der Corona von der Lipidzusammensetzung abhängen, bildet jedes Liposom eine individuelle Corona aus [103]. Dies muss für die weitere Charakterisierung der Vesikel berücksichtigt werden.

Die Liposomen, welche zur Reduktion des Bakterienwachstums gedacht waren, wurden auf ihre Stabilität in 60% FKS untersucht, da die am besten funktionierende Formulierung später im Hühnerembryomodell getestet werden sollte. Die Ergebnisse der Zetasizer Messungen direkt nach, 1h und 2h nach Inkubation in 60% FKS bei 37 °C sind in Tabelle 6 dargestellt. Es wurde hier eine kürzere Inkubationszeit gewählt, da diese ein Kriterium für die selektive Wirkung der PACT ist. Bakterien nehmen den PS in kürzerer Zeit auf als humane Zellen, so werden Bakterien geschädigt, während das umliegende Gewebe geschont wird.

Tabelle 6: Stabilität der Liposomen in 60% FKS

Lipidzusammensetzung	Zeit [min]	Größe [nm] ± SD	Zetapotential [mV] ± SD	PDI
Filmmethode – Hypericin verkapselt				
DOPE/CHEMS/DPPC	0	146 ± 14	-22,3 ± 3	0,46
	60	104 ± 17	-23,4 ± 4	0,26
	120	95 ± 21	-23 ± 2	0,37
DSPC/DPPC/DSPE-PEG	0	127 ± 18	-14,6 ± 4	0,46
	60	100 ± 14	-16,4 ± 2	0,41
	120	142 ± 16	-17,8 ± 5	0,46
DPPC/DOTAP	0	903 ± 58	-7,7 ± 3	1,00
	60	930 ± 103	-8,4 ± 5	0,95
	120	948 ± 156	-9,2 ± 3	1,00

Bei den DPPC/DOTAP Liposomen liegt der PDI bei 1, das heißt die Größenverteilung ist so uneinheitlich, dass man nicht mehr auf bestimmte Größen zurückschließen kann. Der hydrodynamische Durchmesser mit Werten zwischen 903 und 948 nm lässt auf eine Aggregation der Liposomen schließen. Caracciolo et al. berichten von positiv geladenen Liposomen mit DOTAP Anteil, die stabil in humanem Plasma waren und lediglich eine Größenzunahme von 77,7 - 103,9 nm zeigten [101]. Somit ist der Grund für die Aggregation nicht nur die positive Ladung der Oberfläche. Es wäre weiterhin zu untersuchen, ob verschiedene DOTAP/Hypericin Verhältnisse zu stabileren Liposomen führen. Bei den DOPE/CHEMS/DPPC Liposomen nimmt der Durchmesser mit der Inkubationszeit ab, während bei den DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen der Durchmesser erst kleiner wird, danach jedoch wieder zunimmt. Im Fall der DSPC/DPPC/DSPE-PEG Vesikel bleibt der PDI im Verlauf der Messungen konstant. Obwohl der PDI der DOPE/CHEMS/DPPC Liposomen etwas schwankt, scheinen sie dennoch über den Messzeitraum stabil zu sein.

4 *In vitro* Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität der Hypericin-Liposomen – Ergebnisse und Diskussion

4.1 Photodynamische Therapie an Suspensionskulturen

4.1.1 Staphylococcus saprophyticus subsp. bovis

Eine der ersten Studien über PACT mit Hypericin berichtete über die wachstumsstimulierende Wirkung von Hypericin auf *S. aureus* [104]. Dieser eher ernüchternden Studie folgten einige Arbeiten, die eine effektive Inaktivierung von grampositiven Keimen mit Hilfe der Hypericin-vermittelten PACT schildern [105].

Zu Beginn der Experimente wurde die alleinige Wirkung des Lasers und der Effekt der Leerliposomen und des HP β CD mit oder ohne Bestrahlung auf dem grampositiven Keim getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Es konnte für keine der Kombinationen ein hemmender oder wachstumsfördernder Effekt auf *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass alle unter Verwendung von Hypericin auftretenden Effekte auch auf dieses zurückzuführen sind.

Abbildung 22 zeigt die Dark-Toxizität (unbestrahlt) und den photodynamischen Effekt der Hypericin-Liposomen, welche mit Hilfe der Filmmethode verkapseltes Hypericin enthalten. Die Inkubationszeit der Liposomen auf den Bakterien betrug 30 min, und die Fluenz wurde auf 22,2 J/cm² festgesetzt. In der Literatur wird von Fluenzen zwischen 6,3 und 135 J/cm² für die erfolgreiche *in vitro* PACT mit Hypericin berichtet [49,51,78]. Eine Toxizität in Abwesenheit von Laserlicht konnte für keine der Formulierungen beobachtet werden. Freies Hypericin in einer Konzentration von 10 μ M und 20 μ M führte zur Eradikation der Bakterien. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass dieses in DMSO gelöst vorlag und daher nicht für die Applikation am Menschen geeignet wäre. Obwohl somit kein direkter Vergleich mit den liposomalen Formulierungen sinnvoll ist, wird er hier aber trotzdem mit aufgeführt, da er auch in der Literatur verwendet wurde. Ergänzend ist zu erwähnen, dass eine toxische Wirkung von DMSO alleine ausgeschlossen wurde.

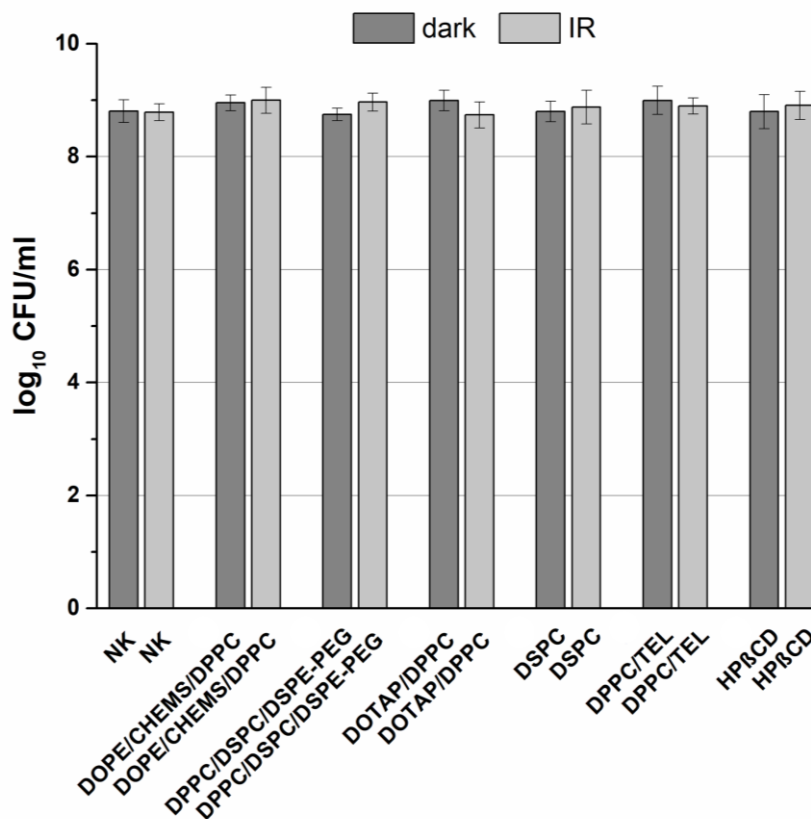


Abbildung 21: Bakterielleres Wachstum von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* nach Inkubation mit Medium (NK=Negativkontrolle) oder verschiedenen Liposomen ohne Wirkstoff ohne Bestrahlung (dark) und mit Bestrahlung (IR) mit einer Fluenz von 22,2 J/cm²

Die DOPE/CHEMS/DPPC Liposomen (10 µM Hypericin) bewirkten eine 2 log₁₀ Reduktion der Bakterien, während die DSPC/DPPC/DSPE-PEG und DPPC/DOTAP (jeweils 10 µM Hypericin) Liposomen das bakterielle Wachstum um jeweils 1,9 log₁₀ hemmten. Des Weiteren gab es keinen Unterschied in der Wirkung von 10 µM oder 20 µM Hypericinesamtkonzentration nach Bestrahlung. Freies Hypericin hingegen zeigte eine konzentrationsabhängige photodynamische Wirkung auf verschiedene *Staphylococcus aureus* Stämme [49]. Dabei reichten bereits 0,25 µM Hypericin aus, um eine Eradikation bestimmter *S. aureus* Stämme zu erzielen [54]. Auch für andere liposomale PS, wie beispielsweise Hematoporphyrin, konnte ein konzentrationsabhängiger PDT-Effekt auf *Staphylococcus aureus* in einem sehr engen Konzentrationsbereich von 0,1-1 µM gefunden werden [106]. Die Verkapselung von Hypericin in Liposomen verhindert offensichtlich, dass ausreichend Hypericin am Wirkort, also auf oder in der Bakterienzelle, vorhanden ist. Um die Ergebnisse besser zu verstehen, ist es wichtig, die Theorie über die drei verschiedenen Aufnahmemechanismen für liposomale PS in Bakterien zu kennen. Der erste Mechanismus beinhaltet die Bindung des Liposoms an die Bakterienzelle

und die anschließende Migration des PS von der Lipidmembran in die bakterielle Zellwand. Die zweite Möglichkeit basiert auf der Fusion der Vesikel mit der Zellwand, gefolgt von der direkten Freisetzung des PS in die Bakterienzelle. Der dritte Aufnahmeweg ist die Freisetzung des PS aus dem Liposom in das umliegende Medium und die folgende Diffusion des PS durch die Zellwand der Mikroben [107]. Da Hypericin eine sehr lipophile Substanz ist, sind die beiden ersten Wege wahrscheinlicher als der letzte, außer es befinden sich Serumproteine im umliegenden Medium, welche eine hohe Affinität zu Hypericin besitzen. Dies ist allerdings nicht der Fall in diesem Versuchsaufbau. Die Menge und die Geschwindigkeit der Hypericinfreisetzung hängt von der Reversibilität der Wechselwirkung zwischen Hypericin und Liposomenmembran ab.

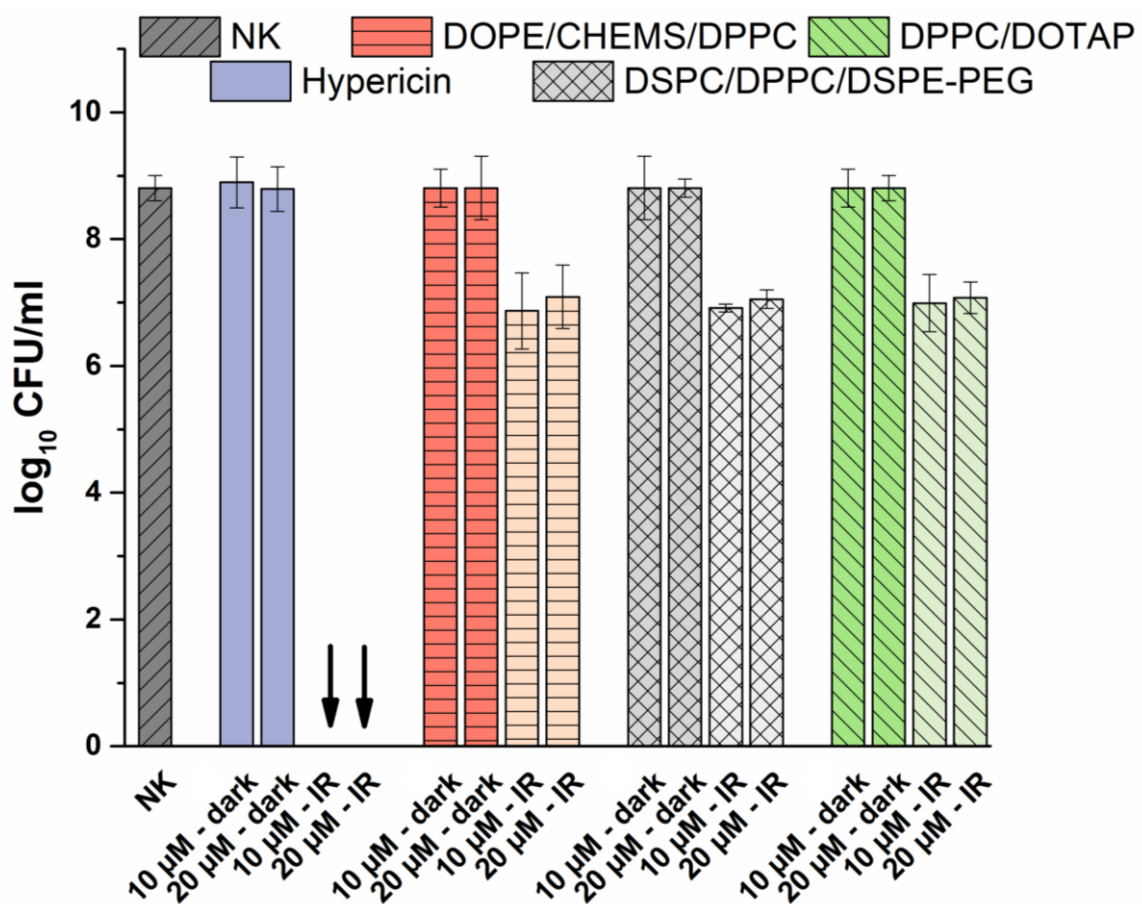


Abbildung 22: *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* nach 30 min Inkubation mit verschiedenen Hypericin Liposomen ohne Bestrahlung (dark) und nach Bestrahlung (IR) mit einem 589 nm Diodenlaser und einer Fluenz von 22,2 J/cm². Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Bakterien. Ein Pfeil steht für die Eradikation der Bakterien

Es bleibt also die Vermutung, dass die Affinität des Hypericins zu den Liposomen höher ist als zur Zellwand der Bakterien. Diese These stützen auch die hohen Liposomen-Bindungskonstanten, die für Hypericin beschrieben wurden [106,107]. So könnte der während der Bestrahlung produzierte Singulett-Sauerstoff von der Liposomenmembran abgeschirmt werden. Des Weiteren ist anzunehmen, dass bei Hypericin Quenching-Effekte auftreten, wenn es sehr dicht in der Liposomenmembran gepackt ist. Die Folge ist der strahlungslose Übergang des Hypericins in den Grundzustand [77]. Beide Effekte führen zu einer Verringerung der photodynamischen Aktivität. Bis jetzt sind keine Hypericin-Liposomen für die PACT in der Literatur beschrieben, jedoch wird von anderen Formulierungen berichtet. Montanha et al. stellten P123 Mizellen, die 37,5 μM Hypericin enthielten, her und erzielten damit eine Reduktion von 2,3 \log_{10} eines *Staphylococcus aureus* Stammes bei einer Bestrahlungsintensität von 6,3 J/cm^2 [51]. Diese Ergebnisse bewegen sich somit im gleichen Bereich wie die hier dargestellten. Nafee et al. schildern die Applikation von Hypericin-Nanopartikeln für die PACT von MRSA *in vitro* und *in vivo*. Jedoch ist es nicht möglich, die Ergebnisse in einen direkten Vergleich zu setzen, da die optische Dichte und nicht die CFU zur Evaluierung des photodynamischen Effekts herangezogen wurden [108].

Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine längere Inkubationszeit die Wirkung der Hypericin-Liposomen verbessern kann. So wurden alle Parameter beibehalten und die Inkubationszeit von 30 min auf 2 h erhöht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Die DOPE/CHEMS/DPPC und DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen bewirkten dabei eine 2,3 \log_{10} Reduktion der Bakterien, während die DPPC/DOTAP Liposomen zu einer Abnahme von 2,6 \log_{10} des bakteriellen Wachstums führten (jeweils 10 μM). Wieder war kein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen festzustellen. Jedoch führte die längere Inkubationszeit zu einer Zunahme der Wachstumsinhibition zwischen 0,3 und 0,6 \log_{10} . Die erzielten Reduktionen reichen allerdings nicht aus, um von einem antibakteriellen Effekt zu sprechen. Dieser ist erst ab einer Hemmung des Wachstums von 3 \log_{10} erreicht. Es lässt sich also vermuten, dass die längere Inkubationszeit zu einer besseren Anreicherung von Hypericin in den Bakterien führt. In der Literatur wurden Inkubationszeiten zwischen 5 min und 2 h für liposomale PS zur Anwendung in der PACT gewählt. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Verlängerung der Inkubationszeit zwar einen Effekt hat, dieser aber nur minimal ist und sich mit zunehmender Konzentration des PS ausgleicht [64, 65]. Bei freiem Hypericin hat die Inkubationszeit offensichtlich keinen Einfluss auf den photodynamischen Effekt. Hier

reichen bereits 5 min aus, um eine effiziente PACT durchzuführen [108]. Für die folgenden Experimente wurde die kürzere Inkubationszeit von 30 min verwendet. Wie bereits erwähnt, ist das auch sinnvoll in Bezug auf die Selektivität der PACT gegenüber Bakterien in Anwesenheit von Humanzellen. Der PS reichert sich sehr schnell in den Bakterien an, hat jedoch keine Zeit sich in größerem Ausmaß in den Zellen anzureichern.

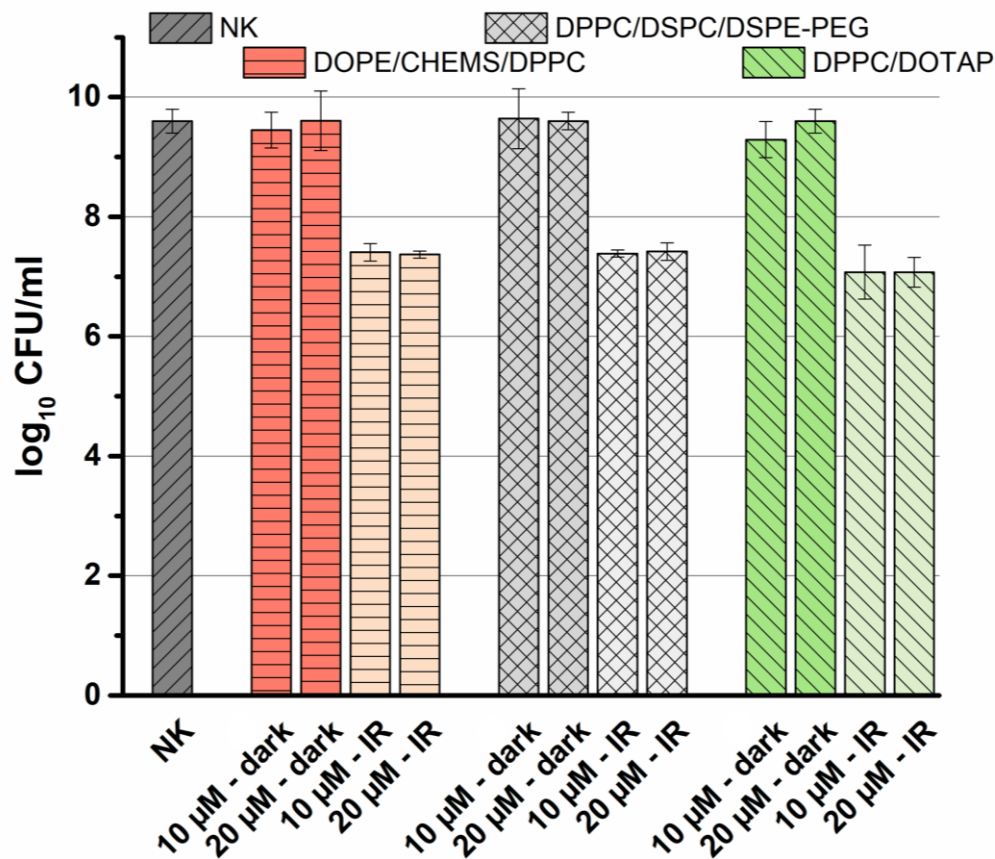


Abbildung 23: *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* nach 2 h Inkubation mit verschiedenen Hypericin Liposomen ohne Bestrahlung (dark) und nach Bestrahlung (IR) mit einem 589 nm Diodenlaser und einer Fluenz von 22,2 J/cm². Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Bakterien.

Da die Vermutung besteht, dass die stark lipophilen Eigenschaften von Hypericin dessen Freisetzung aus den Liposomen beeinträchtigen, war ein neuer Ansatz, wasserlösliches Hypericin im inneren Kompartiment des Liposoms zu verkapseln. Dazu wurde ein Komplex aus Hypericin und HPβCD hergestellt und mit Hilfe der DRV-Methode in verschiedene liposomale Formulierungen eingeschlossen. Abbildung 24 zeigt die Darktoxizität und die photodynamische Aktivität der DRV-Liposomen auf *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*. Hyp-HPβCD zeigt ohne Bestrahlung keinen Effekt auf die Bakterien. Daher war auch zu erwarten, dass die DRV-Vesikel keine Darktoxizität aufweisen, denn die Verkapselung von PS

in Liposomen ist eine häufige Strategie, um deren Darktoxizität herabzusetzen. Der größte antibakterielle Effekt konnte mit dem Hyp-HP β CD Komplex selbst erzielt werden. Hier kam es zur Eradikation der Bakterien sowohl bei 5 μ M als auch bei 2,5 μ M Hyp-HP β CD. Eine in der Literatur beschriebene, wasserlösliche Hypericinformulierung, welche aus dem an Polyvinylpyrrolidon (PVP) gebundenen PS bestand, erzielte auf *S. aureus* eine 5 log₁₀ Reduktion in einer Konzentration von 0,1 μ M bei einer Bestrahlung von 45 J/cm² [50]. Dies deutet darauf hin, dass wässrige Hypericin-Komplexe gute antibakterielle Wirkung gegenüber grampositiven Keimen zeigen. Aber auch die DSPC Vesikel erreichten einen antibakteriellen Effekt durch eine Reduktion des Bakterienwachstums um 3,8 log₁₀ und 4,1 log₁₀ für jeweils 2,5 und 5 μ M Hyp-HP β CD. Die DSPC/DPPC/DSPE-PEG und DPPC/TEL Liposomen hingegen verfehlten die 3 log₁₀ Grenze, hier kam es zu einer Verringerung der CFU um jeweils 2,6 und 1,4 log₁₀ (5 μ M Hyp-HP β CD).

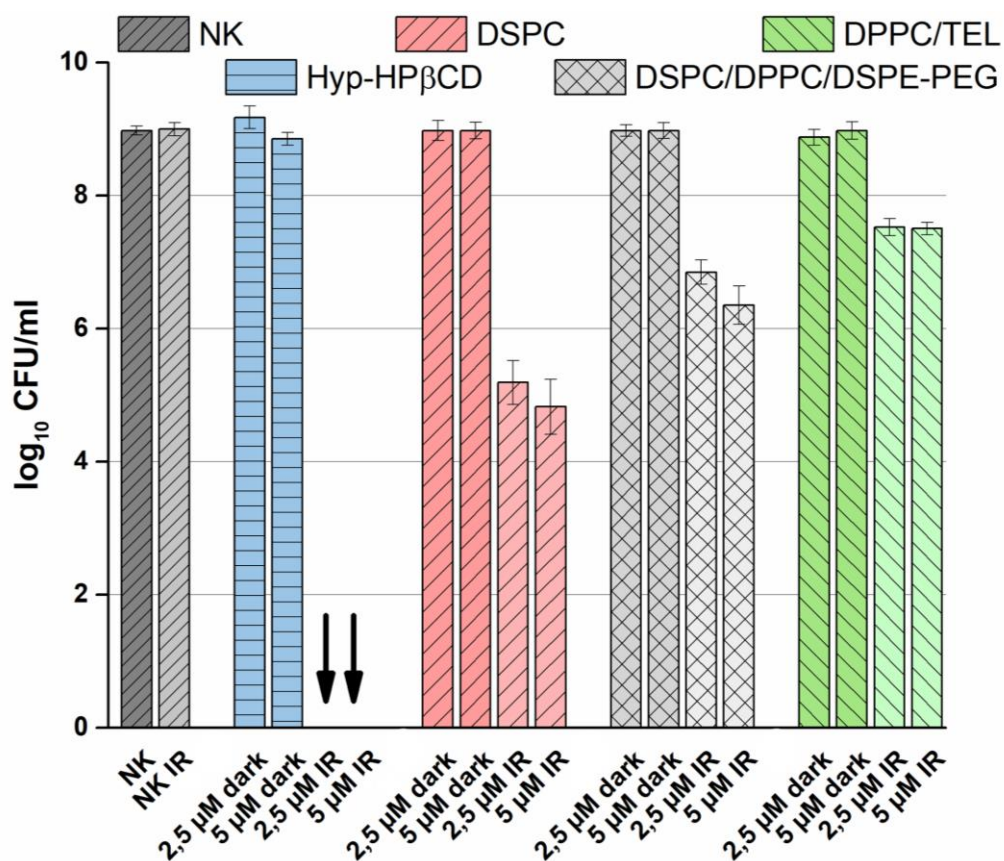


Abbildung 24: *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* nach 30 min Inkubation mit Hyp-HP β CD oder mit verschiedenen DRV Formulierungen von Hypericin ohne Bestrahlung (dark) und nach Bestrahlung (IR) mit einem 589 nm Diodenlaser und einer Fluenz von 22,2 J/cm². Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Bakterien. Ein Pfeil steht für die Eradikation der Bakterien

Verglichen mit den konventionellen Liposomen konnte der photodynamische Effekt durch Herstellung von DRV-Liposomen verbessert werden. Es war sogar möglich, einen stärkeren Effekt zu erzielen, obwohl nur die Hälfte an Gesamthypericin verwendet wurde. Bedenkt man, dass der Wirkungsradius der ROS nur 20 nm beträgt, ist offensichtlich mehr Hypericin aus dem Liposom heraus an den Wirkort gelangt. Ein Grund dafür könnte sein, dass nun alle drei Aufnahmewege von liposomalem PS in Bakterien stattfinden können. Einerseits kann der Komplex in das umliegende Medium oder aber auch durch Fusion des Liposoms mit dem Bakterium direkt in die Zelle freigesetzt werden. Andererseits ist sogar die Migration von Hypericin aus der Liposomenmembran in die Bakterienzellwand nach Anlagerung des Liposoms möglich. Der Grund dafür ist, dass zu einem gewissen Ausmaß Hypericin durch Komponenten der Lipidmembran aus dem Komplex verdrängt werden kann und somit in der Membran des Vesikels wiederzufinden ist [98].

Vergleicht man nun die verschiedenen Lipidkompositionen, stellt sich die Frage, warum die DSPC Vesikel das beste Ergebnis erzielten. Die DPPC/TEL Liposomen besitzen die Membran mit der geringsten Permeabilität und zeigen auch die kleinste photodynamische Wirkung. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Komplex dadurch schlechter freigesetzt wird. Die Vesikel mit der nächstgrößeren Membran sind jedoch die DSPC Liposomen, trotzdem waren diese den DSPC/DPPC/DSPE-PEG überlegen. Ein Grund dafür könnten die sterischen Effekte der PEG-Ketten sein, die verhindern, dass sich das Liposom an die Bakterienmembran anlagert.

4.1.2 *Escherichia coli* DH5α

Liposomen wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um die Aufnahme von Antibiotika durch die äußere Membran von gramnegativen Bakterien zu verbessern und diese somit wieder sensibler gegenüber dem Wirkstoff zu machen [109]. Dieses Experiment untersucht, ob Liposomen auch die photodynamische Wirkung von Hypericin auf *E. coli* DH5α verbessern können. Aufgrund seiner negativen Nettoladung ist Hypericin photodynamisch nicht gegen gramnegative Stämme wirksam, da die äußere Membran eine sichere Permeationsbarriere darstellt [49]. Die Ergebnisse der *in vitro* PACT von *E. coli* DH5α mit konventionellen Liposomen sind in Abbildung 25 dargestellt. Freies Hypericin erreichte eine Verringerung der CFU von 0,9 log₁₀. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von de Melo et al., die

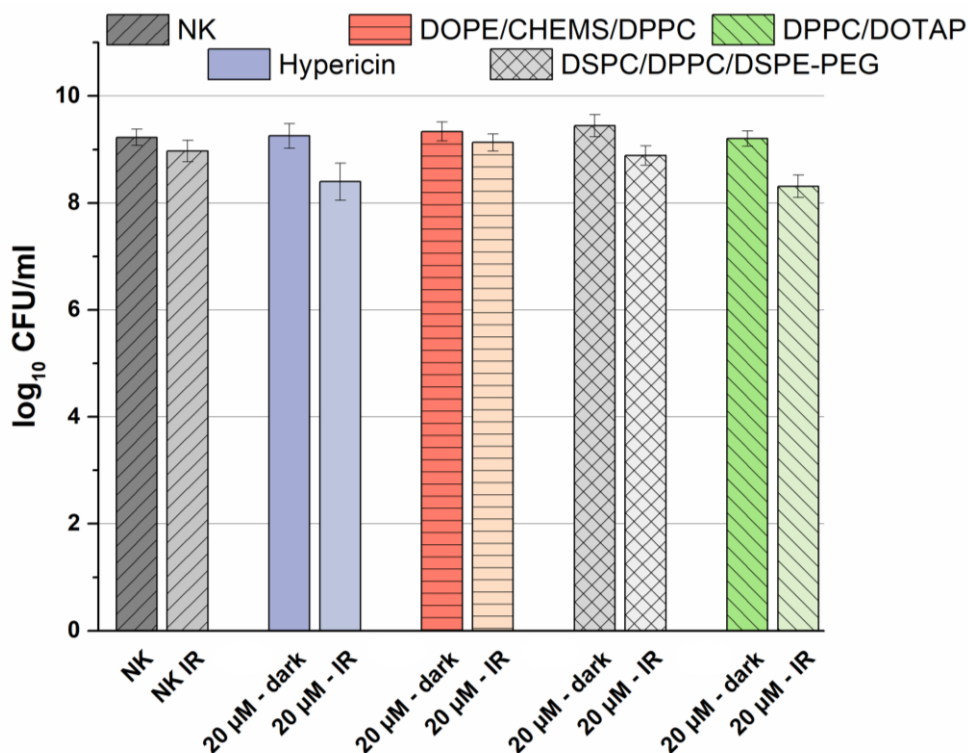


Abbildung 25: *E. coli* DH5α nach 30 min Inkubation mit verschiedenen Hypericin Liposomen ohne Bestrahlung (dark) und nach Bestrahlung (IR) mit einem 589 nm Diodenlaser und einer Fluenz von 22,2 J/cm². Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Bakterien

unter ähnlichen Bedingungen mit freiem Hypericin eine Hemmung von *E. coli* (ATCC 25922) um 0,93 log₁₀ erzielten [53]. Die DOPE/CHEMS/DPPC, DSPC/DPPC/DSPE-PEG und DPPC/DOTAP Vesikel erreichten jeweils nur eine 0,1, 0,4 oder 0,9 log₁₀ Reduktion, bei einer Hypericinesamtkonzentration von 20 µM. Der Effekt der DPPC/DOTAP Vesikel war vergleichbar mit dem von freiem Hypericin, was durch Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen äußeren Membran und der positiv geladenen DOTAP-Kopfgruppen erklärt werden könnte. Die Verwendung von Liposomen konnte die photodynamische Wirkung des PS nicht verbessern, was darauf hindeutet, dass die Affinität von Hypericin zu den Liposomen höher ist. Ein weiterer Grund könnte auch die fehlende Interaktion der Liposomen mit der bakteriellen Membran sein. Jedoch beschrieb Nicolosi et al., dass DOPE/CHEMS/DPPC Vesikel mit der Membran von gramnegativen Stämmen (darunter auch *E. coli*) fusionieren und damit für eine verbesserte Aufnahme von Vancomycin in die Bakterien sorgen. Somit könnte das Hauptproblem die verhinderte Freisetzung von Hypericin aus den Arzneistoffträgern sein.

Da die DRV-Formulierung aus DSPC den phototoxischen Effekt von liposomalem Hypericin auf *S. saprophyticus* verstärken konnte, wurden diese zusammen mit freiem Hyp-HPβCD Komplex auch auf *E. coli* getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Für beide

Formulierungen konnte eine Reduktion des Wachstums von 0,7 log₁₀ festgestellt werden. Die Hyp-HPβCD Einschlussverbindung ist dem freien Hypericin somit nicht überlegen. Auch Engelhardt et al. stellten fest, dass der wasserlösliche Hyp-PVP Komplex keine Wirkung auf *E. coli* zeigt [50]. Dies war zu erwarten, da es zur Aufnahme in die gramnegativen Keime einer positiven Ladung bedarf. So arbeiten Hager et al. an kationischen Hypericinderivaten, um die PACT Wirkung zu verbessern [110]. Die DSPC Vesikel konnten die phototoxische Wirkung nicht verstärken und führen somit vermutlich nicht zu einer verbesserten Aufnahme von Hypericin.

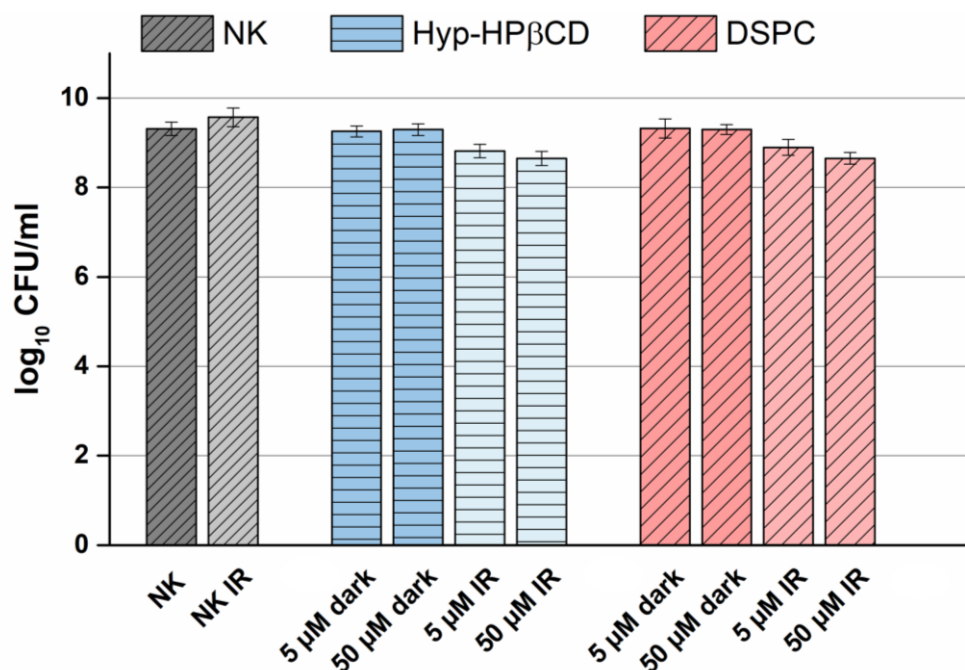


Abbildung 26: *E. coli* DH5α nach 30 min Inkubation mit Hyp-HPβCD oder DSPC-Hyp-HPβCD ohne Bestrahlung (dark) und nach Bestrahlung (IR) mit einem 589 nm Diodenlaser und einer Fluenz von 22,2 J/cm². Als Negativkontrolle (NK) dienten unbehandelte Bakterien

4.2 Bindung von Hypericin an die Bakterienmembran

4.2.1 Bindungsassay

Als nächstes sollte untersucht werden, wieviel Hypericin in oder auf *S. saprophyticus* wiederzufinden ist. Dafür wurden die Bakterien mit den verschiedenen liposomalen Formulierungen in einer Gesamtkonzentration von 5 μg Hypericin inkubiert. Anschließend erfolgte nach Zentrifugation die Lyse des Pellets entweder mit oder ohne vorherigen Waschschrift. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse des Versuchs dar. Bei den konventionellen Liposomen (grün) konnte 0,8 μg Hypericin bei den Bakterien, welche mit DPPC/DOTAP

inkubiert wurden und jeweils 0,17 und 0,25 μg bei DOPE/CHEMS/DPPC und DSPC/DPPC/DSPE-PEG wiedergefunden werden. Wie zu erwarten war, transportierten die DPPC/DOTAP Liposomen am meisten Hypericin zu den Bakterien. Auch nach dem Waschschrift waren noch 0,2 μg Hypericin aus DPPC/DOTAP Vesikeln und nur 0,04 μg bzw. 0,03 μg PS, der durch DOPE/CHEMS/DPPC oder DSPC/DPPC/DSPE-PEG Liposomen transportiert wurde, zu finden. Die DOTAP/DPPC Liposomen zeigen trotz der 4-5-fach höheren Hypericin-Anreicherung am Bakterium nicht den stärksten phototoxischen Effekt. Das spricht

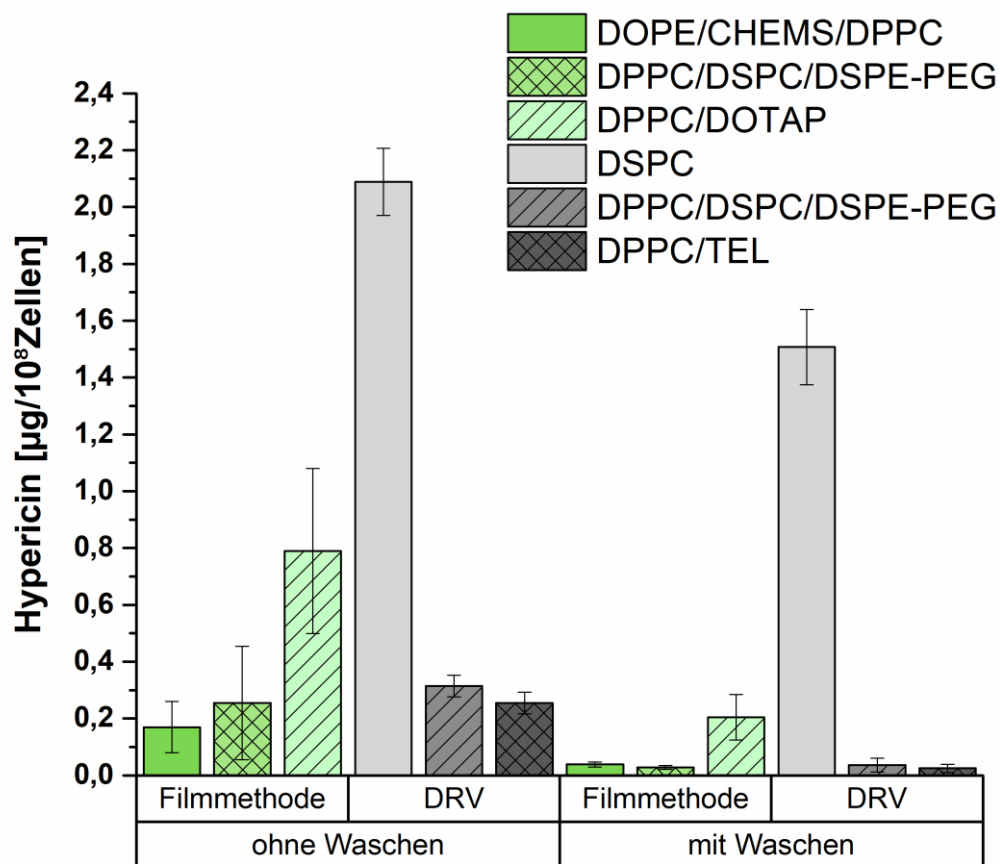


Abbildung 27: Bindung der verschiedenen liposomalen Formulierungen an *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* nach 30 min Inkubation

für die unter 4.1.1 erwähnte Theorie, dass es zu Ereignissen wie beispielsweise der Aggregation von PS Molekülen kommt, die den photodynamischen Effekt abschwächen. Jankowski et al. entdeckten einen ähnlich widersprüchlichen Effekt bei der *in vitro* photodynamischen Therapie von verschiedenen *Shigella flexneri* Stämmen mit freiem Hypericin. Auf dem Stamm, an dem das Hypericin am stärksten gebunden war, vermutlich auf Grund der sehr hydrophoben Zelloberfläche, wurde der geringste phototoxische Effekt gemessen. Die Forscher vermuten, dass die starke Bindung des PS die Penetration von

weiteren angeregten Hypericinmolekülen zum Wirkungsort hemmt [111]. So könnte es auch sein, dass auf den Bakterien haftende Liposomen das Anregungslicht von dem in die Bakterienmembran gelangten Wirkstoff abschirmen. Obwohl für DOTAP berichtet wurde, dass es zu einer Störung der dreidimensionalen Struktur der Bakterienzellwand führt und somit die Permeabilität des PS erhöht [64]. Interessant wäre es nun, verschiedene DPPC/DOTAP/Hypericin Verhältnisse zu testen, um die Wirkung eventuell zu verbessern.

Die durch die DRV-Vesikel vermittelte Aufnahme des PS in die Bakterien korreliert gut mit der phototoxischen Wirkung auf die Bakterien. Die DSPC Liposomen, welche den stärksten photodynamischen Effekt zeigten, brachten 2 µg Hypericin vor bzw. 1,5 µg nach dem Waschschrift zu den Bakterien. Die DPPC/TEL Liposomen mit der geringsten phototoxischen Wirkung transportierten dagegen nur 0,2 bzw. 0,02 µg jeweils vor und nach dem Waschen zu den Keimen, während diese Werte im Fall der DPPC/DSPC/DSPE-PEG Vesikel bei 0,3 bzw. 0,03 µg lagen. Diese Werte sind vergleichbar mit denen der konventionellen DPPC/DSPC/DSPE-PEG und DOPE/CHEMS/DPPC Liposomen, die auch einen vergleichbaren phototoxischen Effekt zeigten.

4.2.2 CLSM Aufnahmen

Die rote Fluoreszenz von Hypericin diente für den qualitativen Nachweis der Akkumulation der Liposomen auf *S. saprophyticus*. Die CLSM Aufnahmen wurden gemacht, nachdem die Bakterien mit Hypericin inkubiert und mit SYTO-9® gefärbt wurden. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff ist in der Lage, die Zellmembran sowohl von lebenden als auch von toten Bakterien zu permeieren und an Nukleinsäuren zu binden, wodurch seine Fluoreszenz verstärkt wird [112]. Abbildung 28 zeigt, dass sich die konventionellen Liposomen und Bakterien am selben Ort befinden. Das lässt auf eine Bindung der Liposomen mit den Bakterien schließen. Abbildung 29 zeigt die Assoziation von Hyp-HPβCD und den DRV-Liposomen mit den Bakterien. Im Fall von Hyp-HPβCD und DSPC-Hyp-HPβCD scheint die Anlagerung an die Keime am stärksten zu sein. Dies korreliert auch mit dem Bindungsassay und den Bestrahlungsversuchen.

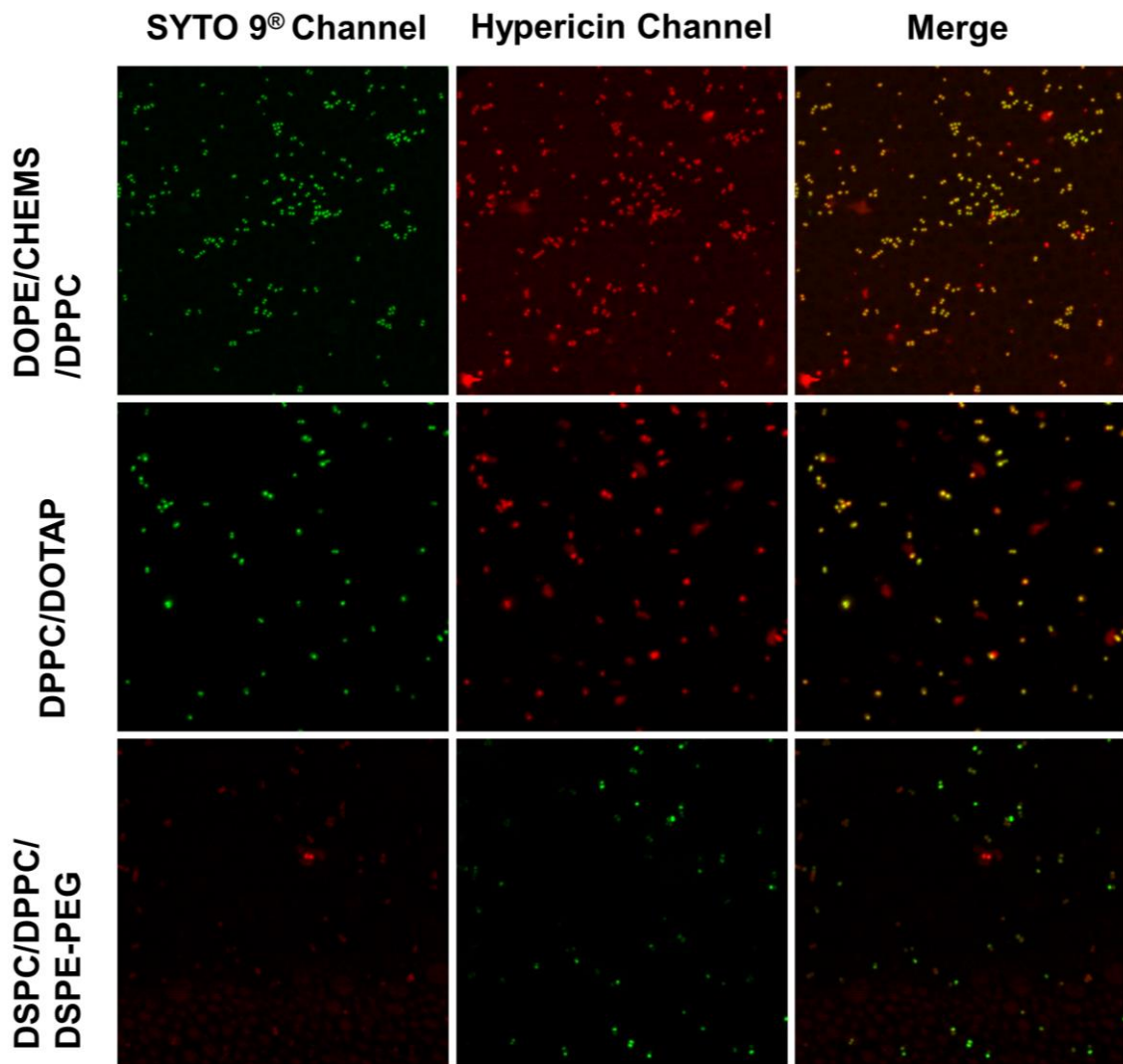


Abbildung 28 CLSM Aufnahmen von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* inkubiert mit konventionellen Liposomen und gefärbt mit SYTO 9®. Hier ist der SYTO 9® und der Hypericin Channel sowie die Überlagerung (merge) der beiden Channel (SYTO 9® / Hypericin) dargestellt

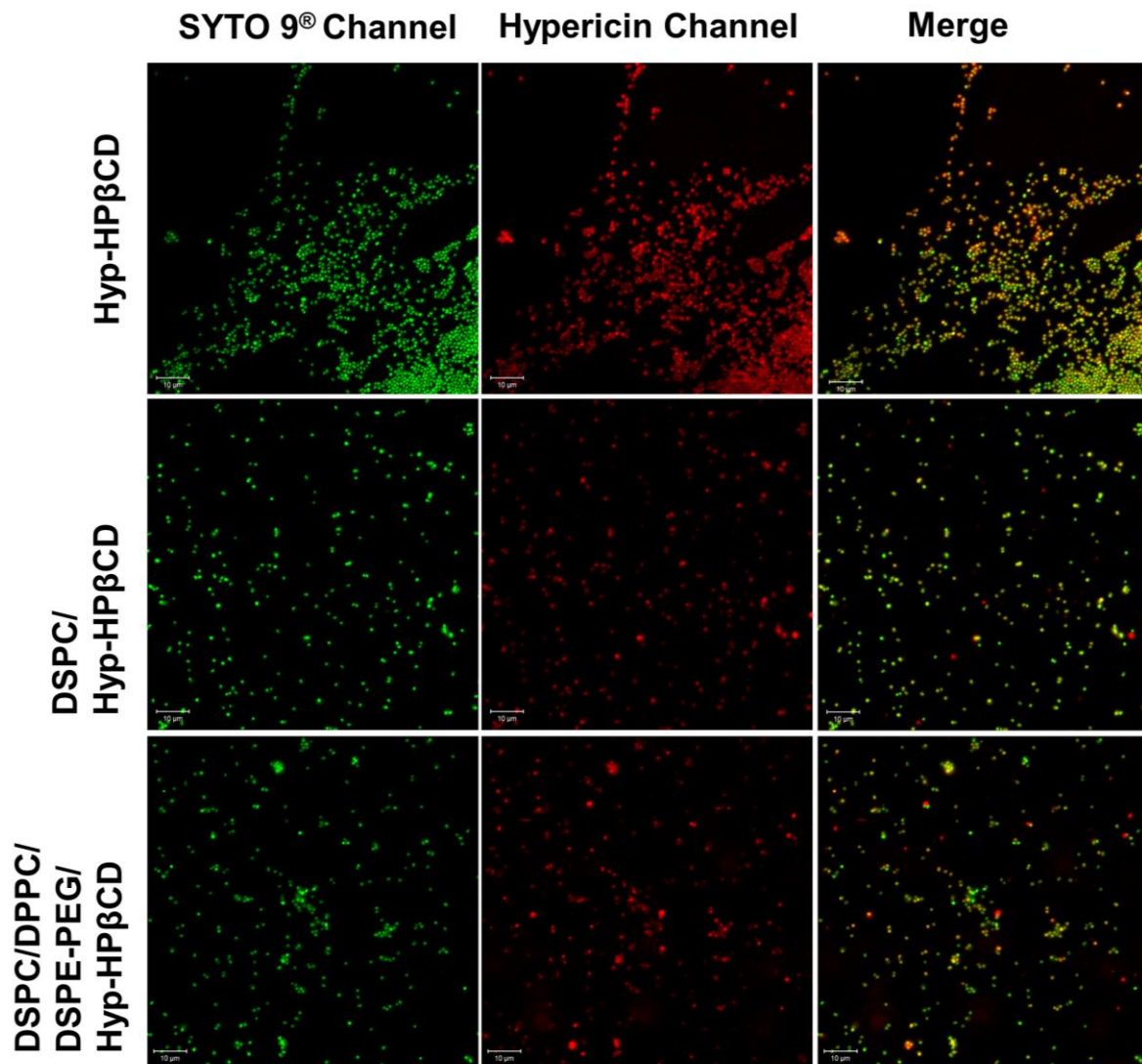


Abbildung 29 CLSM Aufnahmen von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* inkubiert mit DRV Liposomen und gefärbt mit SYTO 9®. Hier ist der SYTO 9® und der Hypericin Channel sowie die Überlagerung (merge) der beiden Channel (SYTO 9® / Hypericin) dargestellt

5 Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität im Hühnerembryomodell – Ergebnisse und Diskussion

Das Hühnerembryomodell und im speziellen die CAM dient als wichtiges Bindeglied zwischen dem *in vitro* Zellkulturmodell und dem Tierversuch. Es gibt bereits einige Versuchsanordnungen, welche die Biokompatibilität von Arzneistoffträgersystemen und die Aktivität, Toxizität, Biodistribution und Pharmakokinetik der verkapselten Wirkstoffe mit Hilfe des Hühnerembryomodells untersuchen [113]. Des Weiteren wurde dieses Modell zur Evaluierung der antiviralen Aktivität von pflanzlichen Extrakten eingesetzt [114]. Nach unseren Recherchen gibt es noch kein Verfahren, welches das Hühnerembryo zur Beurteilung der antibakteriellen photodynamischen Aktivität von PS oder PS-Konjugaten heranzieht.

Vor dem Experiment wurde die CAM freigelegt wie unter 2.9.1 beschrieben. Dadurch konnten die Vitalität des Embryos und eventuelle morphologische Veränderungen während des Versuchs beobachtet werden. Zusätzlich bekam das Ei seitlich einen Zugang mit Luer-Lock Anschluss wie unter 2.5.1 beschrieben. Durch diesen konnten Bakterien und Hypericinformulierungen in den Allantoissack appliziert sowie Proben entnommen werden. Außerdem diente der Zugang für die Bestrahlung des Allantoislumens mit einem Lichtleiter mit Luer-Lock Anschluss. Die Embryos, deren Eier mit einem Zugang versehen waren, lebten über 24 h nach dem Anbringen des Zugangs noch. Auch 24 h nach Injektion von Hypericinformulierungen und anschließender Bestrahlung waren die Embryos noch am Leben. Allerdings veränderte sich nach Behandlung mit freiem Hyp-HP β CD die Struktur der CAM. Die Membran war nicht mehr klar und durchsichtig, sondern zeigte einen silbrigen Schleier. Die Behandlung mit liposomalen Hyp-HP β CD hingegen hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der CAM. Eier welche mit Bakterien beimpft wurden, überlebten 24 h, obwohl ein rasches Bakterienwachstum im Allantois erfolgte. Abbildung 30 zeigt dieses Wachstum über einen Zeitraum von 12 h. Die zusätzliche 10-minütige Bestrahlung mit einem 50 mW Diodenlaser bei 100% Leistung, welche 3,5 h nach der Inokulation mit Bakterien erfolgte, hatte keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum (Abb. 31).

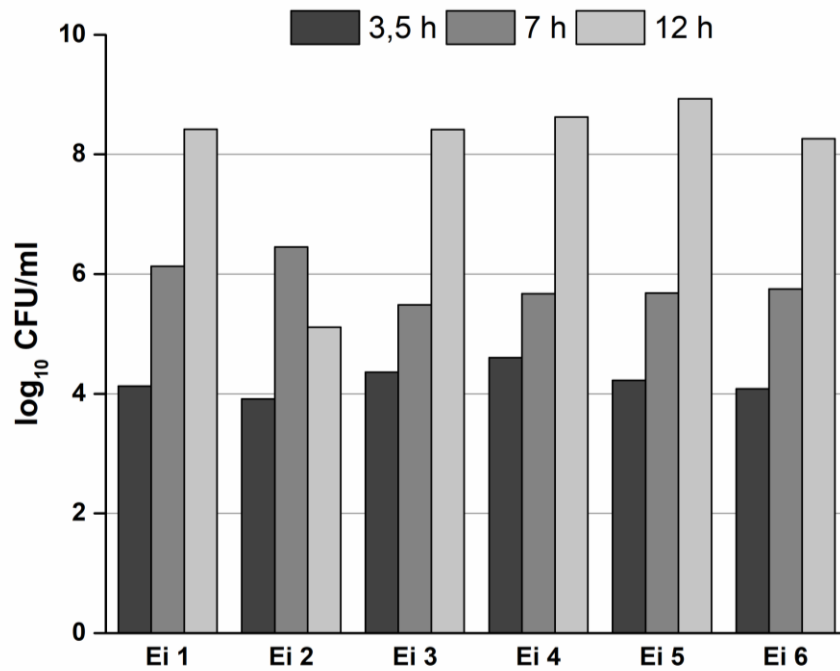


Abbildung 30: Bakterienwachstum im Allantois über 12 h nach Injektion einer Bakteriensuspension in den Allantoissack

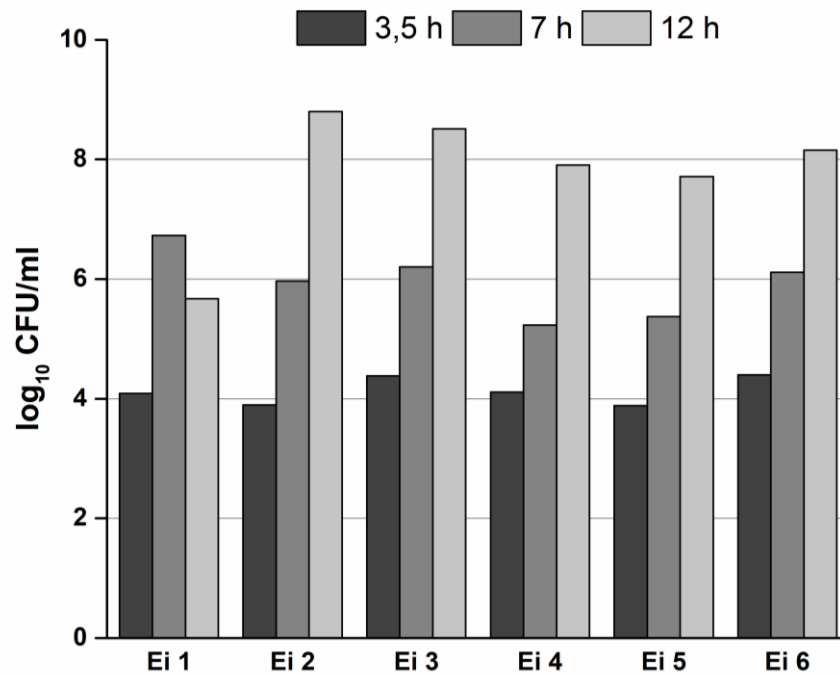


Abbildung 31: Bakterienwachstum im Allantois über 12 h nach Injektion einer Bakteriensuspension in den Allantoissack. Nach 3,5 h fand eine 10-minütige Bestrahlung mit einem 50 mW Diodenlaser bei 100% Leistung statt (589 nm)

Für die photodynamische Behandlung wurde 3 h nach Bakterien Inokulation entweder Hyp-HP β CD oder DSPC/Hyp-HP β CD injiziert und 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit dem Lichtleiter. Eier, welche mit Bakterien infiziert, aber nicht behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe (Abb. 32). Aliquote der Allantoisflüssigkeit wurden vor und nach Bestrahlung und 20 h nach der Behandlung entnommen und die CFU/ml bestimmt.

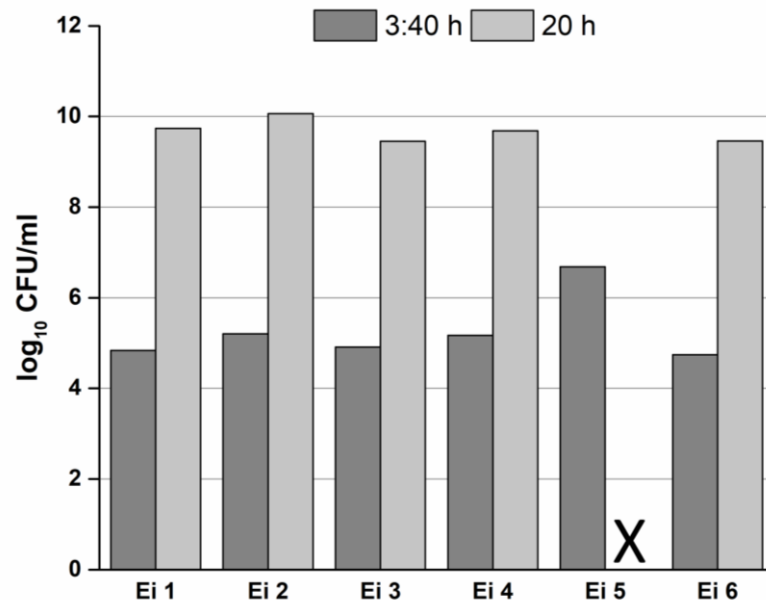


Abbildung 32: Kontrollgruppe: Bakterienwachstum im Allantois nach Injektion einer Bakteriensuspension. Das Wachstum der Bakterien wurde über 20 h beobachtet. Ein X bedeutet, dass der Embryo zum Zeitpunkt des Probenzugs bereits nicht mehr lebte

In Abbildung 33 sind jeweils die Ergebnisse für die Embryos aus der DSPC/Hyp-HP β CD Gruppe dargestellt. Bei Ei 1 und 5 konnte keine Reduktion des Bakterienwachstums im Allantois festgestellt werden. In der Allantoisflüssigkeit von Ei 2, 3, 4 und 6 konnte jeweils eine Reduktion der Bakterien von 1,4, 2,1, 1,2 und 2,8 log₁₀ erreicht werden. Im Durchschnitt konnte so eine Verringerung des bakteriellen Wachstums um 1,2 log₁₀ erzielt werden. Nach 20 h waren die Embryos von Ei 2 und 6 bereits tot. Die Bakterien im Allantois von Ei 1, 4 und 5 sind weitergewachsen. Verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, welche nach 20 h durchschnittlich eine Bakterienanzahl von 9,6 log₁₀ aufwies, haben sich die Bakterien in Ei 4 und 5 weniger stark vermehrt. Hier erreichte die Bakterienanzahl nur Werte von durchschnittlich 7,5 log₁₀. Im Fall von Ei 3 konnte eine komplette Eradikation des Bakterienwachstums erreicht werden. Allerdings zeigte dieses Ei auch das geringste Wachstum zum Zeitpunkt vor der Bestrahlung.

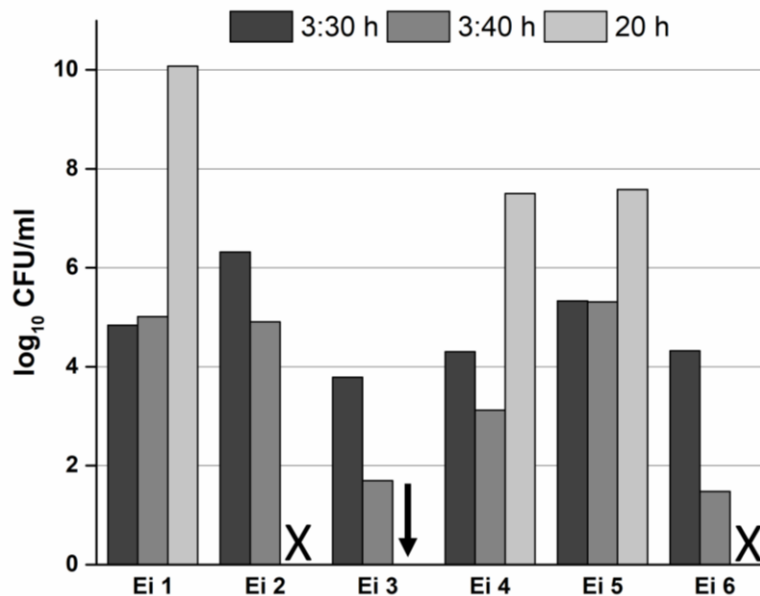


Abbildung 33: Bakterienwachstum im Allantois: 3 h nach Injektion einer Bakteriensuspension wurden DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen injiziert und 30 min inkubiert. Vor Bestrahlung (3:30 h) und nach Bestrahlung (3:40 h) wurde eine Probe gezogen. Das Wachstum der Bakterien wurde über 20 h beobachtet. Ein X bedeutet, dass der Embryo zum Zeitpunkt des Probenzugs bereits nicht mehr lebte. Der Pfeil bedeutet, dass keine Bakterien gewachsen sind

Die Behandlung mit der freien Hypericin-Einschlussverbindung hingegen hatte keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Bakterien (Abb. 34). Die CFU/ml sind hier vor und nach Bestrahlung etwa gleich. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist jedoch auch hier ein geringeres Wachstum nach 20 h zu erkennen. Die Embryos in Ei 1 und 2 sind nach 20 h bereits tot.

Während den *in vitro* Versuchen zeigte Hyp-HP β CD einen wesentlich stärkeren photodynamischen Effekt als die DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen (Kap.4.1.1). Im *in ovo* Modell finden wir genau Gegenteiliges. Die Liposomen scheinen die Bakterien mehr zu schädigen als der freie Komplex. Im Unterschied zu MHB, in dem die *in vitro* Versuche stattfanden, enthält das Allantoisfluid viele Proteine, unter anderem Serumalbumin, zu welchem Hypericin eine hohe Affinität hat [115]. Eventuell ist nach einer Bindung von Hypericin an die Proteine die Verteilung des PS zu den Bakterien abgeschwächt. Hypericin aus der Einschlussverbindung wird vermutlich schneller an die Proteine im Allantoisfluid binden als liposomales Hypericin, das von einer schützenden Lipidmembran umgeben ist. Es wäre weiterhin zu untersuchen, ob liposomales Hypericin länger im Allantoisfluid verteilt vorliegt, während komplexgebundenes Hypericin sich schneller in angrenzenden Membranen verteilt. Ein Indiz dafür ist, dass die CAM nach Behandlung mit Hyp-HP β CD strukturell verändert war, während die Behandlung mit liposomalem Hypericin wenig Einfluss auf die Morphologie der Membran hatte.

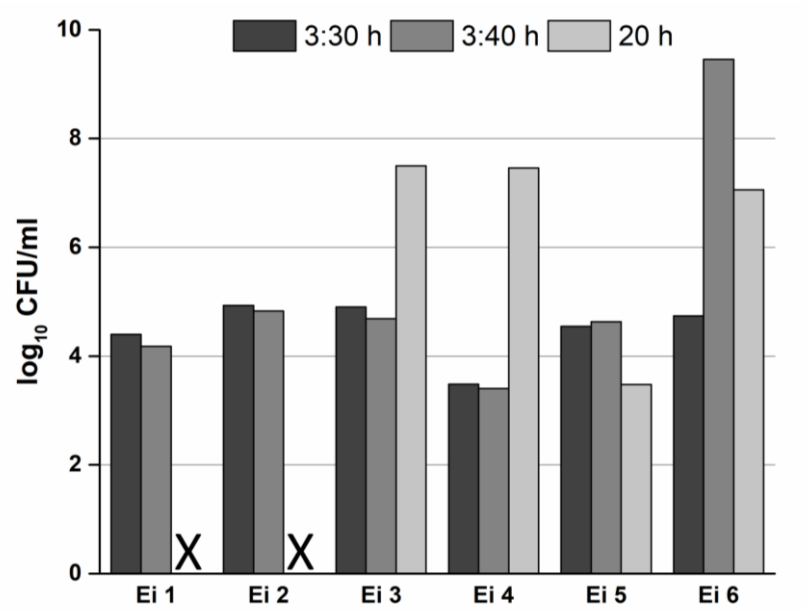


Abbildung 34: Bakterienwachstum im Allantois: 3 h nach Injektion einer Bakteriensuspension wurde Hyp-HP β CD injiziert und 30 min inkubiert. Vor Bestrahlung (3:30 h) und nach Bestrahlung (3:40 h) wurde eine Probe gezogen. Das Wachstum der Bakterien wurde über 20 h beobachtet. Ein X bedeutet, dass der Embryo zum Zeitpunkt des Probenzugs bereits nicht mehr lebte

6 Photodynamische Therapie von Biofilmen –

Ergebnisse und Diskussion

An mehr als 60% der Infektionen, die in Industrieländern behandelt werden, sind Biofilme beteiligt [116]. Dazu zählen unter anderem Biofilme, welche auf Fremdmaterial wachsen, das in den Körper eingebracht wurde, wie beispielsweise zentrale Venenkatheter. Diese finden ein breites Anwendungsspektrum und werden für die Applikation von Medikamenten und parenteraler Ernährung sowie die Hämodialyse gelegt. Bis zu 36% der Todesfälle unter Hämodialysepatienten sind auf Katheter-assoziierte Infektionen zurückzuführen [117]. Wie bereits erwähnt, zeigen Biofilme eine gewisse Toleranz gegenüber Antibiotika und die körpereigene Immunabwehr. Daher ist es umso wichtiger, Ansätze zu entwickeln, um Biofilm-assoziierte Infektionen vorzubeugen und zu behandeln. So wurden die liposomalen Hypericinformulierungen auf ihre Antibiofilm-Aktivität gegenüber einem *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* Biofilm geprüft. Außerdem sollten mit Hypericinformulierungen beschichtete Katheteroberflächen aus PUR auf ihre antibakterielle Wirkung untersucht werden.

6.1 Charakterisierung der Hypericinbeschichtungen

Eine dünne PLGA-Schicht diente als Grundlage für eine stabile und homogene Beschichtung (Abb. 35A). Dabei fiel die Wahl auf Resomer 503H. Ein großer Vorteil von PLGA ist seine gute Biokompatibilität. Aufgrund seiner freien, in Wasser deprotonierten Carboxylgruppen kann dieses mit den positiv geladenen Aminogruppen des Chitosans interagieren. Diese elektrostatischen Wechselwirkungen ermöglichten die Bildung einer dünnen Chitosanschicht (Abb. 35B), die zusätzlich antibakterielle Eigenschaften zeigt [82]. Auf die positiv geladene Chitosanschicht kann nun der negativ geladene Hyp-HP β CD Komplex oder die ebenfalls negativ geladenen Liposomen aufgebracht werden (Abb. 35C/D). Der Gehalt an Hypericin in der Beschichtung betrug $1,7 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei PLGA_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD, $2,7 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD und $4,0 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Liposomenschicht nicht zusammenhängend war. Das könnte den geringen Gehalt von Hypericin in der PLGA_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD Beschichtung erklären.

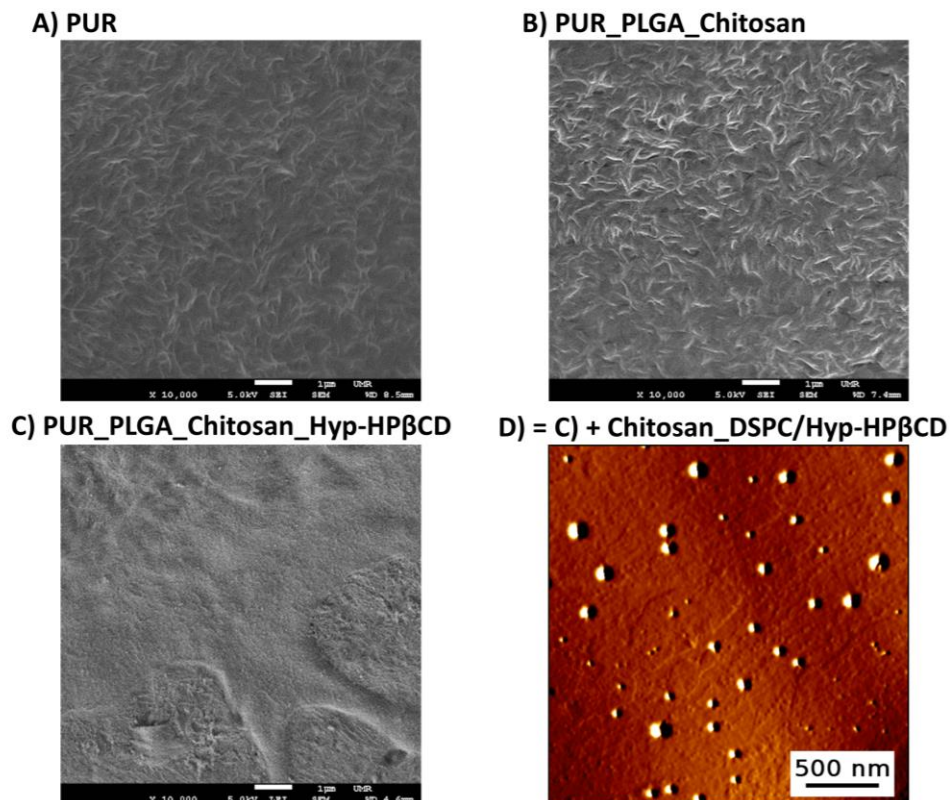


Abbildung 35: Aufbau der modifizierten PUR-Oberfläche (Vergrößerung 10 000, Scalebar 1 μm): (A) PUR-Oberfläche, (B) mit PLGA und Chitosan modifizierte Oberfläche, (C) nach Auflagerung von Hyp-HP β CD Komplex. Das AFM-Bild (D) zeigt eine zusätzliche Chitosanschicht auf der Hyp-HP β CD Liposomen adhärert sind

6.2 Charakterisierung des Biofilm-Wachstums

Die Biofilme konnten mit Hilfe eines Mikrotiterplatten Assays beurteilt werden. Dieser wurde nach der Stephanovic Klassifizierung, wie unter 2.6.2 beschrieben, ausgewertet. Die Cut-off OD (OD_c), errechnete sich aus drei Standardabweichungen über der mittleren OD der Negativkontrolle und betrug 0,115. Der Biofilm zeigte eine OD von $2,8 \pm 0,13$ und konnte somit als starker Biofilmbildner identifiziert werden. Außerdem wurde ein auf PUR gezüchteter Biofilm mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisiert (Abb. 36).

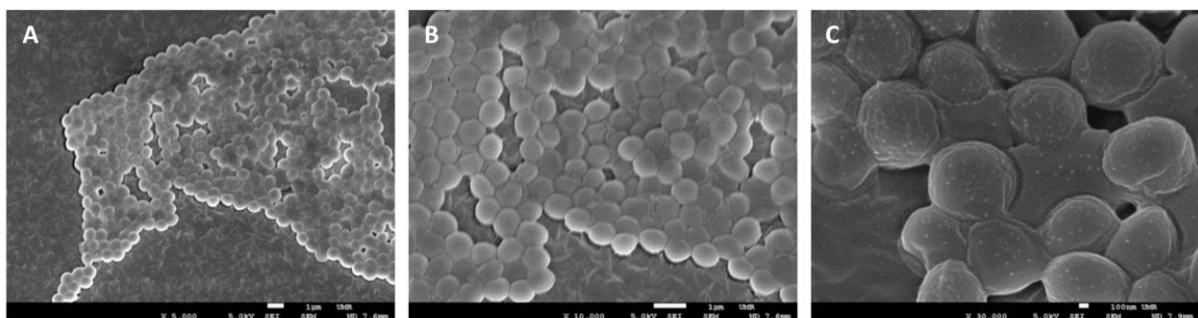


Abbildung 36: Visualisierung des Biofilmwachstums mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Vergrößerung: A x 5000, B x 10000 und C x 30000)

6.3 Photodynamische Therapie von Biofilmen

Vor dem Experiment wurde sichergestellt, dass leere Liposomen und HP β CD, sowohl bestrahlt als auch unbestrahlt, keinen Effekt auf den Biofilm zeigen. Die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung eines Biofilms von *Staphylococcus saprophyticus* susp. *bovis*, welcher in einer 48-Well-Platte gezüchtet wurde, ist in Abbildung 37 dargestellt. Es konnte für keine Formulierung eine Dark-Toxizität festgestellt werden. Freier Komplex zeigte eine 5,8 log₁₀ Reduktion des Biofilmwachstums und somit den stärksten phototoxischen Effekt. Die DSPC/Hyp-HP β CD Vesikel erreichten eine 4 log₁₀ Reduktion, während die DSPC/DPPC/DSPE-PEG/Hyp-HP β CD Liposomen das Wachstum nur um 2 log₁₀ senken konnte. Damit die Formulierungen auf dem Biofilm einen vergleichbaren Effekt wie in der Suspensionskultur erzielen konnten, musste die Konzentration auf 40 μ M und die Fluenz auf 40 J/cm² erhöht werden. Das geringere Ansprechen von Biofilmen auf die PACT wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt und kann vielfältige Gründe haben, die bereits in der Einleitung erläutert wurden. Weiterhin wurde die Inkubationszeit auf 1 h erhöht, was eine tiefere Penetration des PS in den Biofilm ermöglichen soll [54]. Da vor der Bestrahlung die Hypericinformulierungen durch PBS-Puffer ersetzt wurden, ist davon auszugehen, dass der PS in den Biofilm eingedrungen ist.

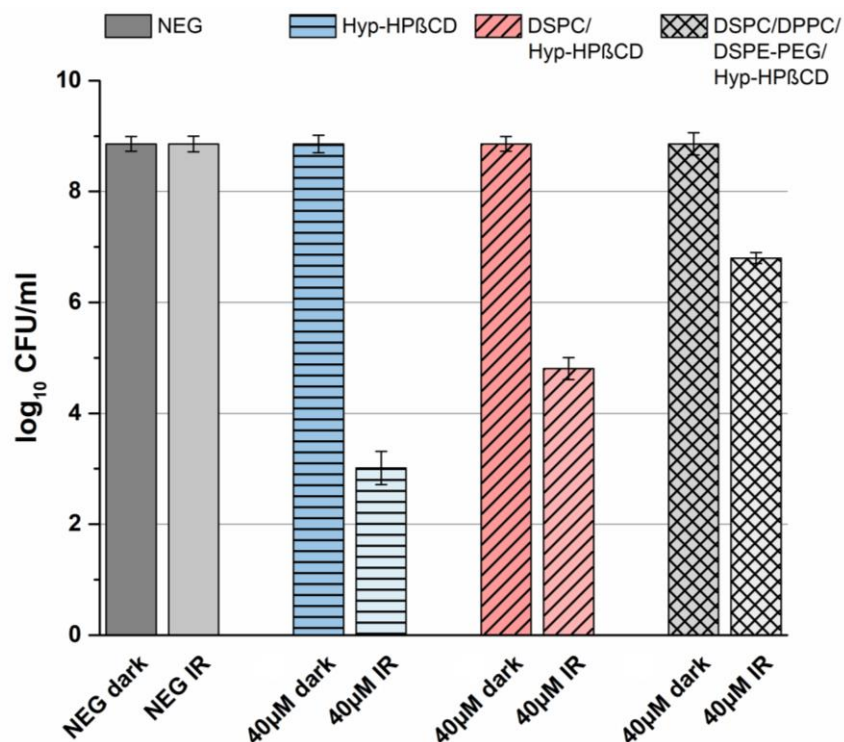


Abbildung 37: CFU/ml von unbehandelten (NEG) und mit Hyp-HP β CD oder Hyp-HP β CD Liposomen behandelten Biofilmen nach 1h Inkubation, jeweils ohne oder mit Bestrahlung bei 40 J/cm²

Des Weiteren wurden Biofilme in einem PUR-Röhrchen gezüchtet und mit DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen oder Hyp-HP β CD in einer Endkonzentration von 8 μ g/Röhrchen inkubiert. Die anschließende Bestrahlung führte zu einer Reduktion der Lebendkeimzahl von jeweils 2,4 oder 5,3 \log_{10} nach der Behandlung mit Liposomen oder Hyp-HP β CD (Abb. 38A). Die photodynamisch vermittelte antibakterielle Wirkung von modifizierten PUR Oberflächen ist in Abbildung 38B dargestellt. Die Bestrahlung (IR) und die Kombination aus Bestrahlung und Ultraschall (IR+US) hatten keinen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien, welche auf unmodifiziertem PUR wuchsen (NK). Das Gleiche konnte für Bakterien, welche auf mit PLGA/Chitosan beschichtetem PUR wuchsen, beobachtet werden. Die Bestrahlung von mit Hypericin modifizierten PUR Oberflächen führte jeweils zu einer 4,3, 2,3 und 3,8 \log_{10} Reduktion des bakteriellen Wachstums im Fall von Hyp-HP β CD, DSPC/Hyp-HP β CD oder der Kombination aus beidem. Dieser antimikrobielle Effekt konnte durch die adjuvante Anwendung von Ultraschall verstärkt werden. Besonders deutlich wurde das im Fall von mit Hyp-HP β CD beschichteten Oberflächen, welche zu einer 6,8 \log_{10} Verringerung der Bakterien

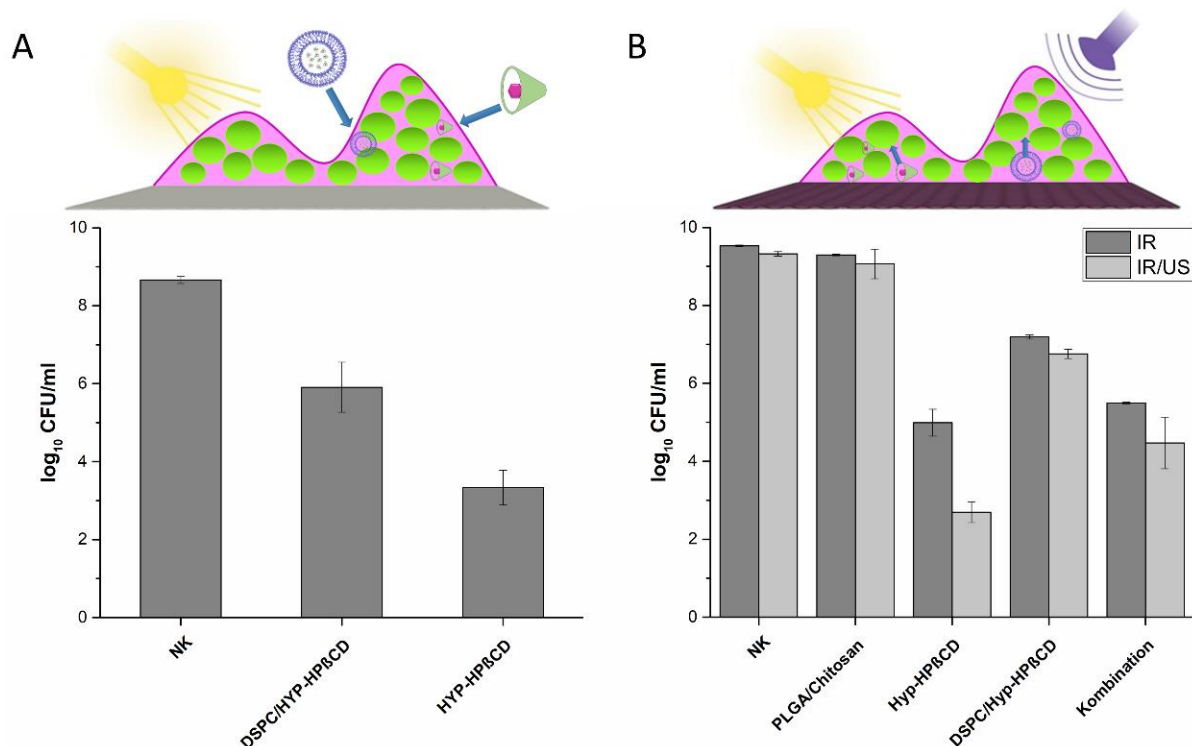


Abbildung 38: (A) Biofilme die auf PUR gezüchtet wurden und 1 h mit Medium (Negativkontrolle (NK)), 40 μ M Hyp-HP β CD Liposomen oder 40 μ M Hyp-HP β CD bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einer Fluenz von 40 J/cm² bestrahlt wurden. (B) Biofilme die in PUR-Röhrchen (NK) oder in oberflächenmodifizierten PUR Röhrchen gezüchtet wurden (PLGA_Chitosan, PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD (Hyp-HP β CD), PLGA_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD (DSPC/Hyp-HP β CD) oder PLGA_Chitosan_Hyp-HP β CD_Chitosan_DSPC/Hyp-HP β CD (Kombination)). Es erfolgte eine Bestrahlung mit einer Fluenz von 9,2 J/cm² (IR) oder eine Bestrahlung in Kombination mit Ultraschall (IR/US)

fürten. Außerdem verbesserte die Ultraschall-Anwendung die antibakterielle Wirkung der mit Liposomen oder der Kombination aus Hyp-HP β CD und DSPC/Hyp-HP β CD modifizierten Oberfläche auf jeweils 2,7 und 5 log₁₀ Reduktion. Es konnte für keine Formulierung eine Darktoxizität festgestellt werden.

Somit ist die Hyp-HP β CD Beschichtung den anderen Oberflächenmodifikationen im Hinblick auf die Biofilminaktivierung überlegen. Durch die zusätzliche Anwendung von Ultraschall konnte die antibakterielle Wirkung der Oberflächenmodifikationen verstärkt werden. Dieser Effekt war am deutlichsten im Falle der Hyp-HP β CD Beschichtung. Der Grund dafür könnte eine stärkere Freisetzung des Hypericins und eine verbesserte Penetration des PS in den Biofilm sein. Zusätzlich könnte die Antibiofilm-PACT von den höheren Sauerstoffkonzentrationen in den tieferen Schichten des Biofilms, nach Ultraschallanwendung profitieren [118]. Betrachtet man die niedrigen Hypericinkonzentrationen in den Schichten, wird deutlich, dass es effektiver ist, die Biofilme mit Hilfe von modifizierten Oberflächen zu behandeln anstatt den PS von außen zuzugeben, was wesentlich höhere PS Konzentrationen verlangt. Eventuell führt die kontinuierliche PS Freisetzung aus dem Kathetermaterial schon während des Biofilmwachstums zu einer gleichmäßigeren Verteilung des PS im Biofilm.

Al Meslmani B.M. et al. stellten eine Beschichtung auf PET Implantaten her, welche aus einem antibakteriellen Di-Blockcopolymer bestand und zu einer 62,1% Reduktion des grampositiven Bakterienwachstums führte [119]. In einer anderen Arbeit verbesserten sie die Beschichtung und erreichten eine 87,8% Verringerung des bakteriellen Wachstums, indem sie Lysozym auf der Polymeroberfläche immobilisierten [120]. Jedoch kann man hier noch nicht von einem antibakteriellen Effekt sprechen, da dieser erst ab einer Reduktion von 99,9% erreicht ist [52]. Dayyoub E. et al. beluden PLGA-Filme mit Silbernanopartikeln und Norfloxacin, was zu einer Abnahme der Bakterienanzahl von 99,952% führte [121]. Im Vergleich dazu zeigten die PLGA/Hypericin Filme eine photodynamische antibakterielle Wirkung mit einer 99,993% Reduktion. Die zusätzliche Anwendung von Ultraschall führte zu einer Verringerung um 99,99998%. Ein weiterer Vorteil der photodynamischen Beschichtung gegenüber Beschichtungen mit Antibiotika ist die Vermeidung von Resistenzbildungen, welche bei Antibiotikatherapie auftreten.

6.4 Visualisierung der photodynamischen Inaktivierung der Biofilme

Abbildung 39 stellt den Vergleich zwischen einem Biofilm, der auf PUR gewachsen ist, und einem Biofilm, der auf Hyp-HP β CD modifizierten PUR gezüchtet wurde, mit und ohne Bestrahlung dar. Alle Proben wurden mit Hilfe von Konfokalmikroskopie oder REM visualisiert.

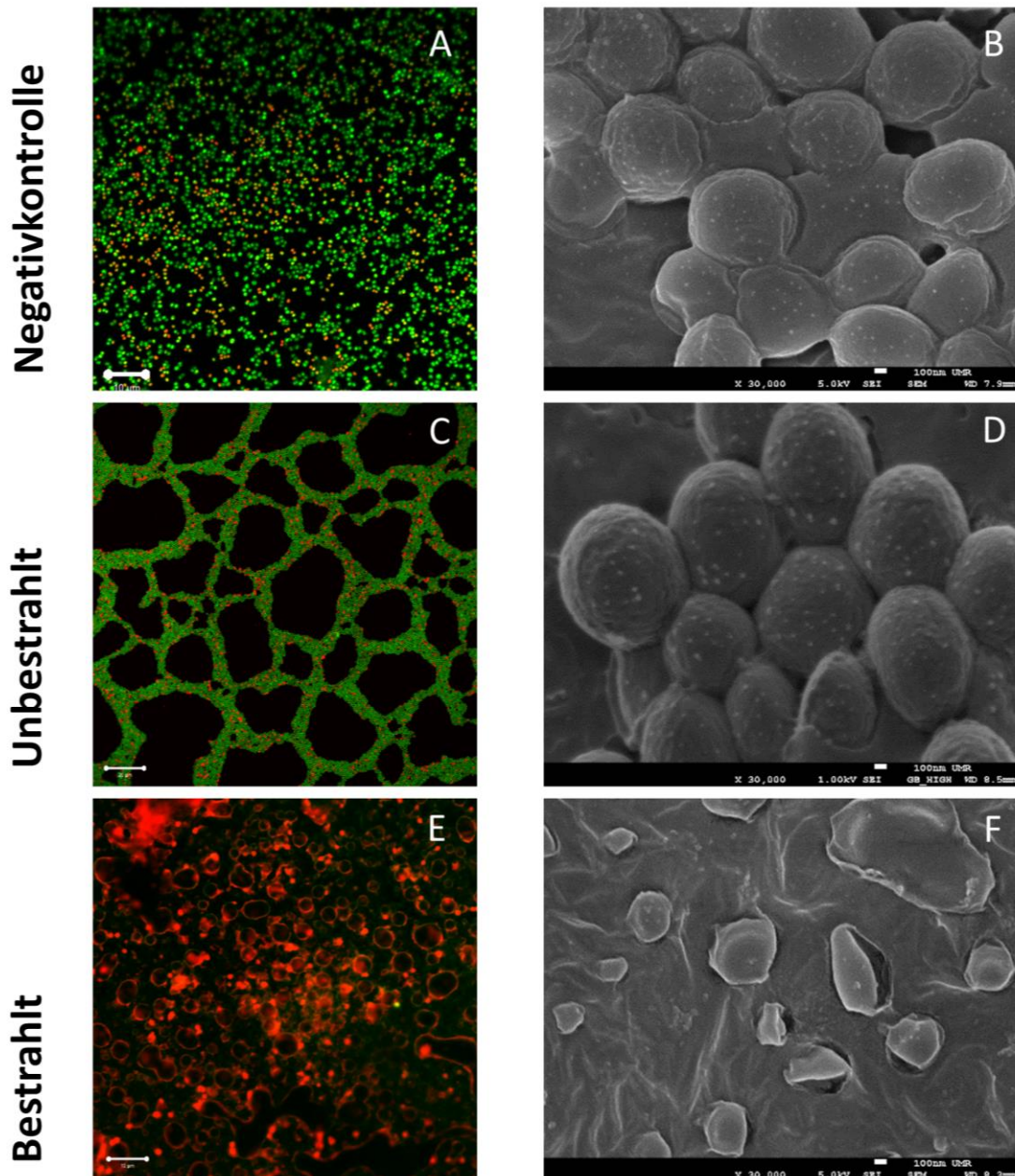


Abbildung 39: CLSM Aufnahmen von mit LIVE/DEAD BacLight Kit gefärbten Biofilmen, auf PUR (A / Scalebar: 10 μ m) oder Hyp-HP β CD modifizierten PUR vor (C / Scalebar: 20 μ m) und nach Bestrahlung (E / Scalebar: 10 μ m). Die REM Aufnahmen zeigen Biofilm und Zellwandstruktur von Biofilmen auf PUR (B / Vergrößerung x 30000) oder Hyp-HP β CD modifiziertem PUR vor (D / Vergrößerung x 30000) und nach Bestrahlung (F / Vergrößerung x 30000)

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde das BacLight LIVE/DEAD Kit verwendet. Somit konnte zwischen lebenden Bakterien, welche eine grüne Fluoreszenz aufweisen, und toten Bakterien, die rot fluoreszieren, unterschieden werden. Abbildung 39A zeigt eine mit Biofilm bewachsene Oberfläche und in Abbildung 39B kann man deutlich die extrazelluläre Matrix des Biofilms erkennen. Die Oberflächenmodifikation scheint das Wachstum des Biofilms zu beeinflussen, was in Abbildung 39C zu erkennen ist. Hier sieht man eine Honigwabenstruktur der Staphylokokken. Nach der Bestrahlung ist der Großteil der Bakterien tot, was deutlich an der roten Fluoreszenz von Propidiumiodid in Abbildung 39E zu erkennen ist. Der Nukleinsäureinterkalator kann nur geschädigte Zellmembranen durchdringen, nicht jedoch intakte. Die Zerstörung der Zellmembranen und der Biofilmstruktur wird auch in Abbildung 39F nochmal deutlich.

7 *In vitro* Untersuchung der photodynamischen Aktivität auf SK-OV-3 Zellen – Ergebnisse und Diskussion

7.1 Zytotoxizität auf Tumorzellen (SK-OV-3)

Derycke et al. vermuteten bereits, dass eine Voraussetzung für die stabile Verkapselung von Hypericin in Liposomen eine möglichst rigide Membran ist [75]. Diese soll verhindern, dass Hypericin aufgrund seiner hohen Affinität zu Plasmaproteinen frühzeitig aus den Liposomen freigesetzt wird und ausreichend Hypericin beladene Liposomen zum Tumor transportiert werden können. In dieser Arbeit sollten DSPC-Liposomen, die aufgrund ihrer langen gesättigten Lipidketten und der hohen Phasenübergangstemperatur sehr rigide Vesikel bilden, mit Liposomen bestehend aus TEL/DPPC verglichen werden. Diese bilden wie unter 1.5.5 beschrieben ebenfalls rigide Membranen mit geringer Permeabilität. Dabei wurden die zwei unter Punkt 2.1.3.1 und 2.1.3.2 beschriebenen Verkapselungsstrategien gewählt. Der Einfluss der Lipidzusammensetzung und der intraliposomalen Lokalisation des Hypericin auf den photodynamischen Effekt der Formulierungen in SK-OV-3 Zellen wurde im Folgenden untersucht.

Abbildung 40A zeigt die Dark-Toxizität der Liposomen. Für die DPPC/TEL Liposomen, Hyp-HP β CD und DSPC/Hyp-HP β CD ist diese vernachlässigbar. Lediglich die DSPC/Hyp Liposomen besitzen eine geringe Toxizität ohne Bestrahlung. Abbildung 40B-E zeigt die dosisabhängige Phototoxizität aller Formulierungen nach 4 h Inkubation und jeweils 2,1, 4,1, 8,3 und 12,4 J/cm² Bestrahlung. Da die Liposomen vor der Bestrahlung abgesaugt wurden, ist davon auszugehen, dass der phototoxische Effekt von intrazellulärem Hypericin oder von auf der Zelle gebundenem PS herrührt. Bedenkt man zusätzlich, dass die Lokalisation des PS aufgrund des geringen Wirkungsradius des Singulett-Sauerstoffs essentiell für die Phototoxizität ist, lässt sich vermuten, dass die Aufnahme von Hypericin in die Zellen konzentrationsabhängig stattfindet. Der hier eingesetzte Dosisbereich stimmt überein mit den von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Konzentrationen, die einen Hypericin-vermittelten PDT-Effekt auf Tumorzellen erzielten [122].

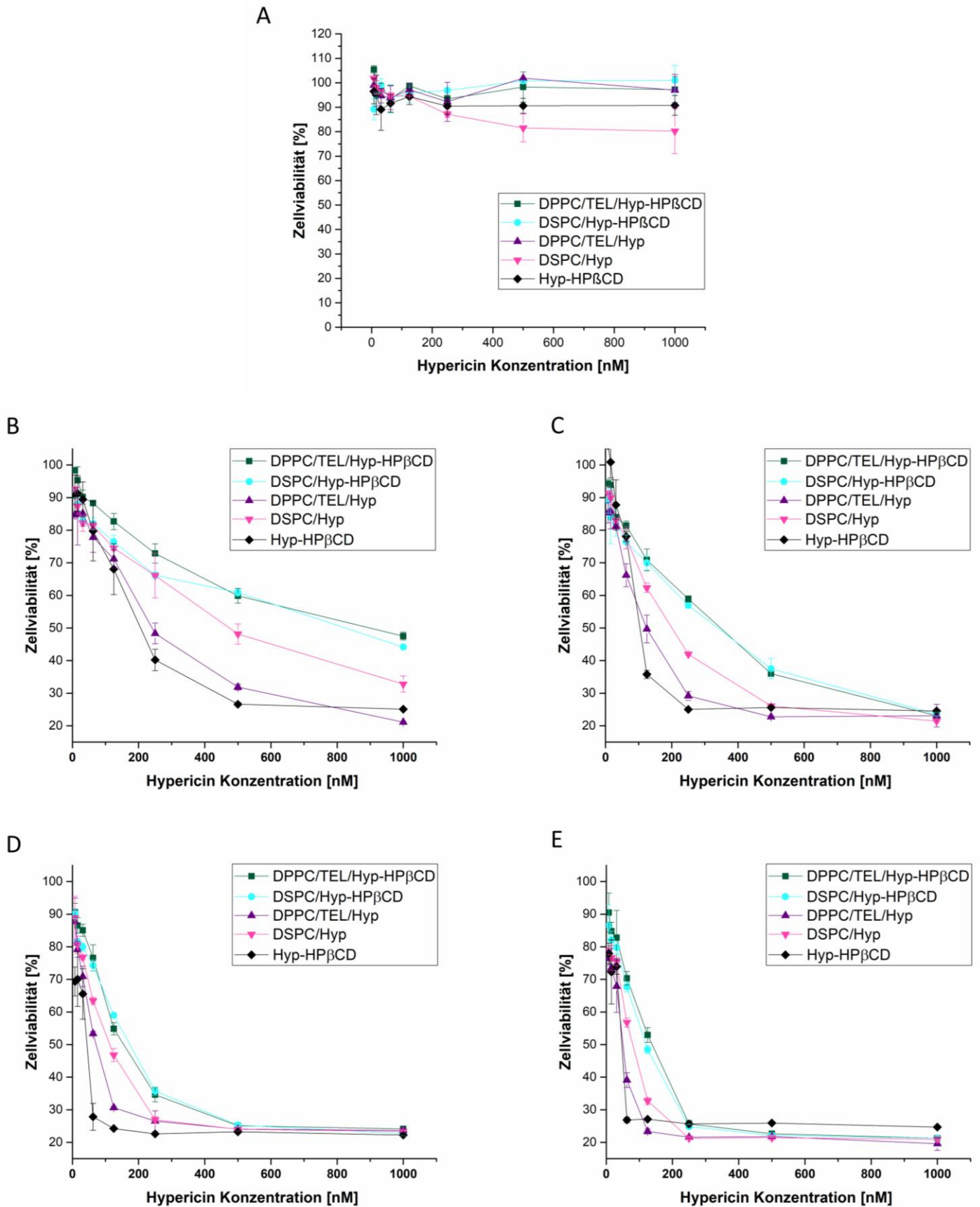


Abbildung 40: (A) Dark-Toxizität der verschiedenen Formulierungen auf SK-OV-3 Zellen, welche mit verschiedenen Konzentrationen Hyp-HP β CD Komplex oder Hypericin-Liposomen 4 h lang inkubiert und anschließend mit 2,1 J/cm² (B), 4,1 J/cm² (C), 8,3 J/cm² (D) und 12,4 J/cm² (E) bestrahlt wurden

Die stärkste Phototoxizität, mit IC_{50} Werten von jeweils 48 und 42 nM, zeigten DPPC/TEL/Hyp Vesikel und freies Hyp-HP β CD bei einer Fluenz von 12,4 J/cm² (Tab. 7). Bei der gleichen Fluenz führten die DSPC/Hyp, DSPC/Hyp-HP β CD und DPPC/TEL/Hyp-HP β CD zu IC_{50} Werten von jeweils 82, 120 und 136 nM. Allerdings ist festzustellen, dass diese Werte bei einer geringeren Fluenz von 2,1 J/cm² erheblich weiter auseinanderliegen. Zwar bleibt die Reihenfolge der Phototoxizität bei dieser Fluenz gleich (Hyp-HP β CD > DPPC/TEL/Hyp > DSPC/Hyp > DSPC/Hyp-HP β CD > DPPC/TEL/Hyp-HP β CD), jedoch liegen die IC_{50} Werte jetzt bei jeweils 192, 237, 464, 821 und 880 nM. Auch Abbildung 40B-E zeigt, dass es ab einer Konzentration von 250 nM bei steigender Fluenz zu einer Nivellierung des photodynamischen Effekts der verschiedenen Zubereitungen kommt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch von Derycke et al. entdeckt, nach Steigerung der Lichtdosen glich sich die Phototoxizität zweier Liposomenformulierungen, die bei geringeren Fluenzen signifikante Unterschiede zeigten, an. Die DRV Liposomen zeigen bei kleineren Lichtdosen eine geringere photodynamische Wirkung als ihre konventionellen Pendants. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Hypericin in Liposomen, die eventuell noch auf der Zellmembran haften, bei dieser Verkapselungsstrategie besser vor Licht geschützt ist. Diese These unterstützt auch der Vorschlag von Ioele et al., Liposomen, die einen Wirkstoff-CD-Komplex verkapseln, zum Schutz photosensitiver Wirkstoffe zu verwenden [123]. Die DPPC/TEL/Hyp Liposomen scheinen den DSPC/Hyp Liposomen im phototoxischen Effekt überlegen zu sein. Man könnte somit vermuten, dass DPPC/TEL Liposomen mehr Wirkstoff zu den Zellen transportieren.

Abbildung 41A-E zeigt den Effekt der Inkubationszeit (1, 2 oder 4 h) der jeweiligen Formulierung auf die photodynamische Wirkung bei einer Bestrahlung mit 8,3 J/cm². Diese hat nahezu keinen Einfluss auf die photodynamische Wirkung von Hyp-HP β CD, jedoch erhebliche Bedeutung für die der Liposomen. Abbildung 41F fasst diese Graphen noch einmal zusammen und zeigt die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für alle Formulierungen mit einer Gesamtkonzentration von 250 nM. Dabei wird deutlich, dass sich die Wirkung der DRV-Liposomen erst nach 4 h Inkubation zeigt, während die konventionellen Liposomen schon nach 2 h Inkubation eine gewisse Zytotoxizität aufweisen.

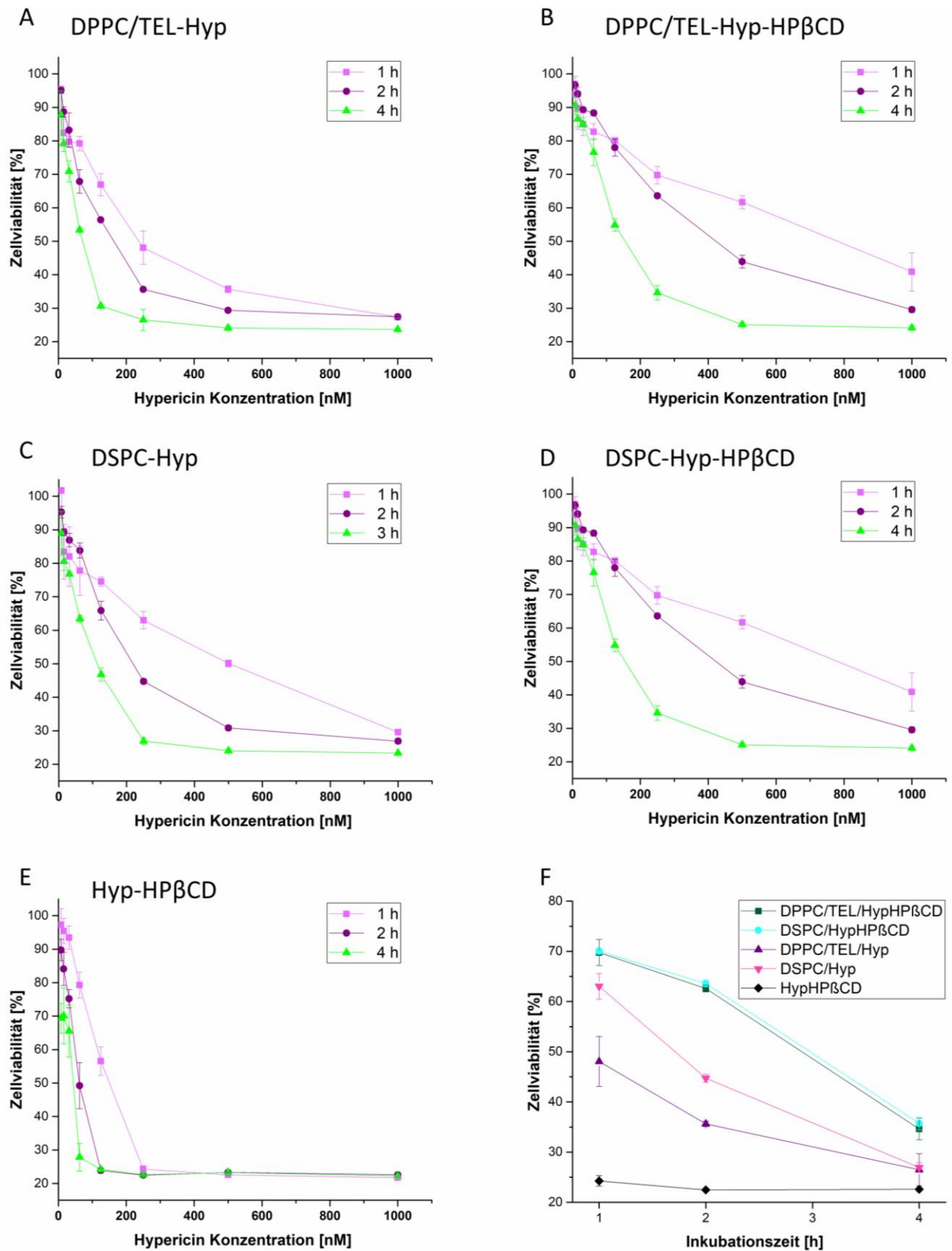


Abbildung 41: (A-E) Photodynamische Aktivität der verschiedenen Hypericinformulierungen auf SK-OV-3 Zellen nach 1, 2 und 4 h Inkubation und anschließender Bestrahlung mit 8,3 J/cm². (F) Vergleich der Hypericinformulierungen mit einer Gesamtkonzentration von 250 nM bei verschiedenen Inkubationszeiten und nach Bestrahlung mit 8,3 J/cm²

Tabelle 7: IC₅₀ Werte der verschiedenen liposomalen Formulierungen und Hyp-HPβCD. Die Werte wurden anhand der Graphen aus Abbildung 40 kalkuliert

Liposomenformulierung	Fluenz [J/cm ²]	IC ₅₀ [nM]
DSPC/Hyp	2,1	464
	4,1	192
	8,3	115
	12,4	82
DSPC/Hyp-HPβCD	2,1	821
	4,1	322
	8,3	162
	12,4	120
DPPC/TEL/Hyp	2,1	237
	4,1	119
	8,3	71
	12,4	48
DPPC/TEL/Hyp-HPβCD	2,1	880
	4,1	345
	8,3	148
	12,4	136
Hyp-HPβCD	2,1	192
	4,1	108
	8,3	50
	12,4	42

7.2 Aufnahme von Hypericin in die Zellen

Der qualitative Nachweis für die Aufnahme der Hypericin-Liposomen in die SK-OV-3 Zellen wurde unter Verwendung der Konfokalmikroskopie erbracht (Abb. 42/43). Nach 4 h Inkubation mit 1 μM der verschiedenen Formulierungen konnte eine beachtliche Akkumulation von Hypericin in den Zellen beobachtet werden. Allerdings war kein Unterschied im Erscheinungsbild bestrahlter und unbestrahlter Zellen zu sehen. Nach der Inkubation mit freiem Hyp-HP β CD zeigten die Zellen eine intensivere Fluoreszenz (Abb. 42). Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass die Verteilung der Einschlussverbindung innerhalb der Zellen wesentlich diffuser ist. Obwohl Hyp-HP β CD offensichtlich am besten aufgenommen wird, ist die Aufnahme weniger zielgerichtet als die der liposomalen Formulierungen. Außerdem wird intravenös verabreichtes HP β CD nach 4 h zu 90% über die renale Clearance eliminiert, gleichzeitig binden die lipophilen Komponenten der Einschlussverbindung an Plasmaproteine [124]. Daher ist die Verkapselung des Komplexes notwendig, um ein kontrolliertes Tumortargeting zu erreichen.

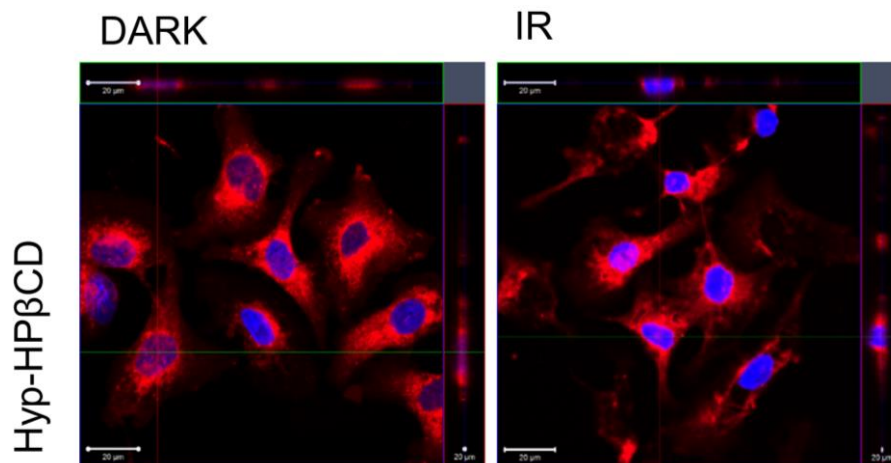


Abbildung 42: CLSM Aufnahmen von SK-OV-3 Zellen die mit Hyp-HP β CD Komplex inkubiert wurden (Scalebar 20 μm). Die Endkonzentration betrug 1 μM . Die Aufnahmen wurden vor und nach Bestrahlung mit einer Fluenz von 4,1 J/cm² gemacht

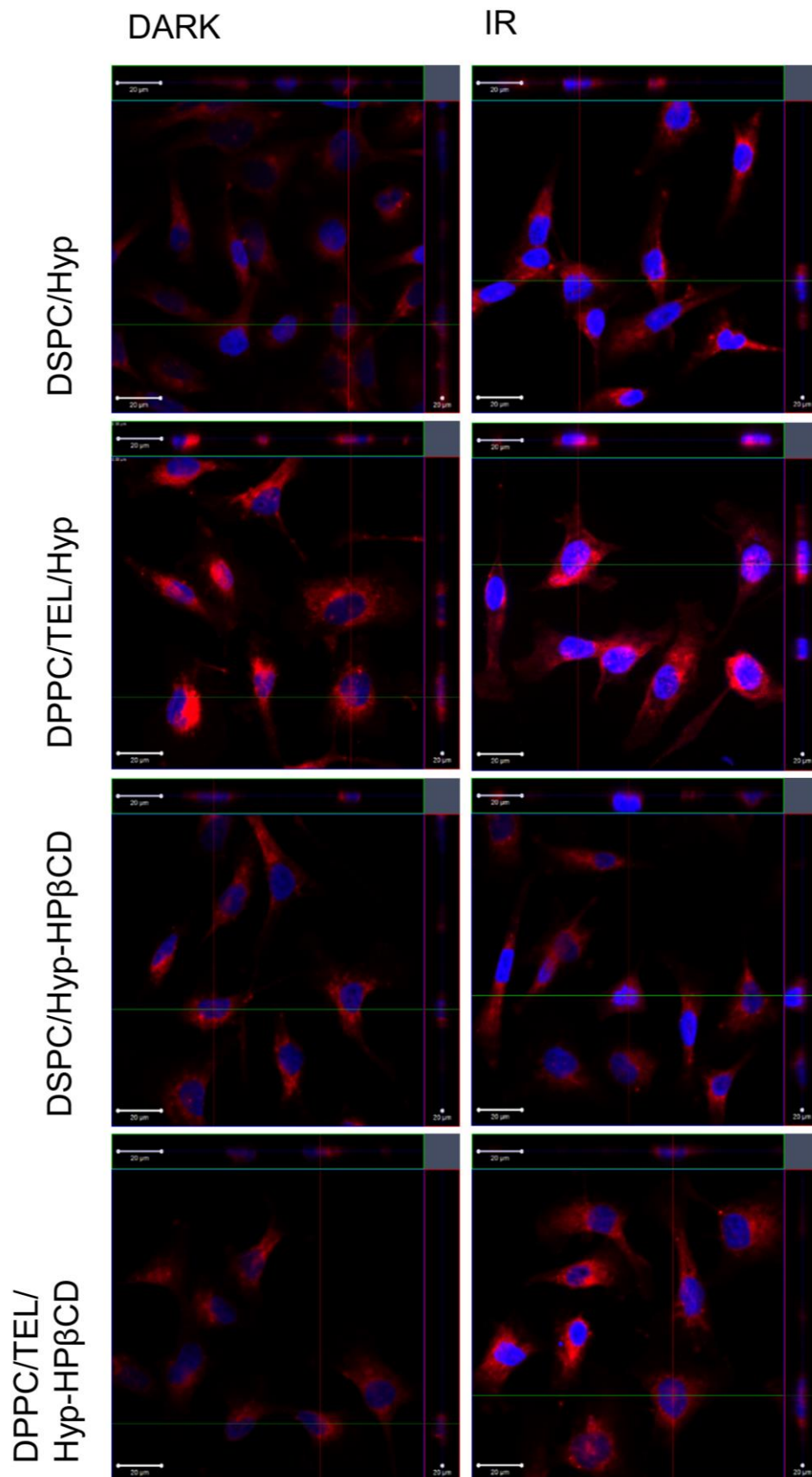


Abbildung 43: CLSM Aufnahmen von SK-OV-3 Zellen die entweder mit DSPC oder DPPC/TEL (90/10 mol%) Liposomen, welche Hypericin oder Hyp-HP β CD Komplex verkapselten, inkubiert wurden (Scalebar 20 μ m). Die Endkonzentration betrug 1 μ M. Die Aufnahmen wurden vor und nach Bestrahlung mit einer Fluenz von 4,1 J/cm² gemacht

7.3 Charakterisierung des endozytotischen Aufnahmemechanismus

Generell können vier verschiedene Mechanismen der Liposom-Zell Interaktion unterschieden werden. Zum einen kann die Adsorption des Liposoms auf der Zellmembran dazu führen, dass Wirkstoff außerhalb der Zelle freigesetzt wird. Oder es kommt zu einer Fusion des Liposoms mit der Zellmembran, wobei der Wirkstoff ins Zytoplasma entlassen wird. Eine weitere Möglichkeit ist der Transfer oder Austausch von Lipidkomponenten zwischen Liposom und Zellmembran nach erfolgter Adsorption. Schließlich besteht noch die Option der Aufnahme des Liposoms durch Endozytose [125]. Bei der Fusion und der Adsorption von Liposomen handelt es sich um unspezifische Vorgänge. Endozytose hingegen ist ein aktiver Prozess, der ligandeninduziert oder auch ohne einen äußeren Reiz stattfinden kann [126]. Dabei wird extrazelluläres Material durch die Bildung einer Einstülpung in der Zellmembran, welche als Vesikel in das Innere der Zelle abgeschnürt wird, internalisiert. Es lassen sich verschiedene endozytotische Prozesse unterscheiden. Um den Einfluss der Endozytose auf die Aufnahme der Liposomen zu beurteilen, wurde die Clathrin-vermittelte Endozytose mit Chlorpromazin und die Caveolae-vermittelte Endozytose durch Filipin III gehemmt. Daneben kann noch die Non-clathrin-non-caveolae vermittelte Endozytose und in einigen Fällen die Makropinozytose auftreten.

Vor dem Versuch wurde sichergestellt, dass die Inkubation der SK-OV-3 Zellen mit Inhibitoren und Liposomen in Abwesenheit von Licht keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Abbildung 44 zeigt, dass die Inhibitoren alleine, trotz Bestrahlung, keinen Effekt auf die Zellen zeigen. Zellen, die nur mit Liposomen inkubiert wurden, konnten diese ungehindert aufnehmen und zeigten somit eine Abnahme der Viabilität nach Bestrahlung. Die zusätzliche Präinkubation mit Filipin III hatte keinen inhibierenden Effekt auf die Aufnahme der Liposomen, da die phototoxische Wirkung unverändert blieb. Die Vorbehandlung mit Chlorpromazin hingegen führte zu einer Hemmung der Liposomenaufnahme. Diese Resultate werden durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gestützt, welche feststellen, dass für Vesikel bis zu einer Größe von 200 nm der vorwiegende Aufnahmemechanismus die Bildung von „Clathrin-coated pits“ ist [116].

Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den DRV-Liposomen. Hier ist nahezu kein phototoxischer Effekt mehr festzustellen. Die phototoxische Wirkung der Filmmethode-Vesikel hingegen ließ sich nicht vollständig durch Chlorpromazin hemmen. Hier kommen offensichtlich noch andere Wege der Hypericinaufnahme in Betracht. Daher lassen diese

Ergebnisse vermuten, dass aufgrund der stabilen Verkapselung der Hypericin-Einschlussverbindung hauptsächlich die Endozytose als Aufnahmeweg in Frage kommt. Die Filmmethode-Vesikel hingegen scheinen leichter destabilisiert zu werden und könnten so schon Hypericin außerhalb der Zelle, beispielsweise nach Adsorption, freisetzen. Des Weiteren könnte Hypericin dann an Serumproteine wie LDL binden, welche auch einen Carrier für Hypericin in die Zelle darstellen [127].

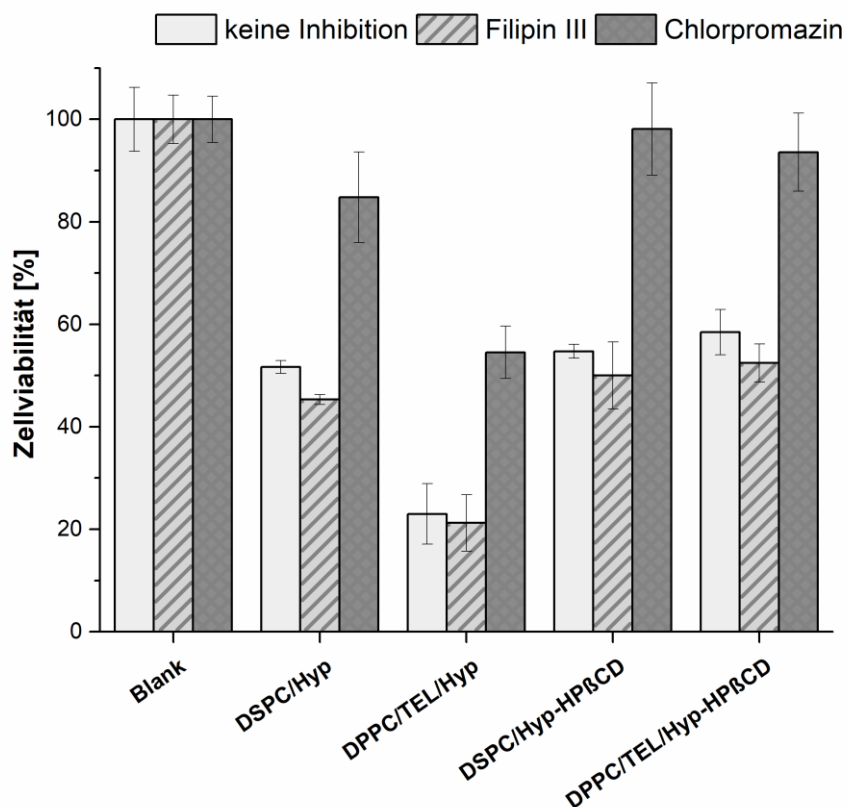


Abbildung 44: Zellviabilität von SK-OV-3 Zellen nach 3 h Inkubation mit Medium (Blank) oder verschiedenen liposomalen Formulierungen (250 nM Hypericin) und Bestrahlung bei 8.3 J/cm². Die Endozytosewege waren entweder unbeeinträchtigt (keine Inhibition) oder wurden mit Filipin III oder Chlorpromazin gehemmt

7.4 Hämokompatibilität

Ideale Liposomen besitzen nach i.v. Applikation unter anderem eine lange Blutzirkulationszeit, welche ihnen ermöglicht, ihre Fracht zu den Tumorzellen zu transportieren. Die *in vitro* Untersuchung des Kontaktes zwischen Liposomen und Blut spielt daher eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Materialeigenschaften der Carrier und der Festlegung einer sicheren *in vivo* Konzentration. Blut besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, mit welchen der Arzneistoffträger kompatibel sein sollte. Darunter fallen unter anderem Erythrozyten und Gerinnungsfaktoren.

7.4.1 Hämolysse-Assay

Hämolysse ist definiert als Veränderung, Auflösung oder Zerstörung der Erythrozytenmembran, welche in einer Freisetzung von Hämoglobin in das Plasma resultiert [128]. Das freigesetzte Hämoglobin kann zu einer Reizung der Blutgefäße, Phlebitis, Anämie, Gelbsucht, Bilirubinenzephalopathie, akutem Nierenversagen und in manchen Fällen sogar zum Tod führen [129]. Dem *in vitro* Assay liegt die quantitative Bestimmung von Oxyhämoglobin zu Grunde, welches entsteht, indem Hämoglobin an Sauerstoff bindet. Oxyhämoglobin kann bei 540 nm spektrophotometrisch gemessen werden. Die Absorption von mit Triton X-100 behandelten Erythrozyten diene als Positivkontrolle, da Triton X-100 in der Lage ist, die Blutzellen vollständig zu lysieren [130]. Unbehandeltes Blut diene als Negativkontrolle. Hämolyssewerte unter 10% sind als unbedenklich und nicht hämolytisch einzustufen, während Formulierungen, die Werte über 25% induzieren, als hämolytisch zu betrachten sind [129]. Die in dieser Arbeit hergestellten Hypericin-Liposomen sowie die Hypericin-Einschlussverbindung zeigten kein hämolytisches Potential (Abb. 45).

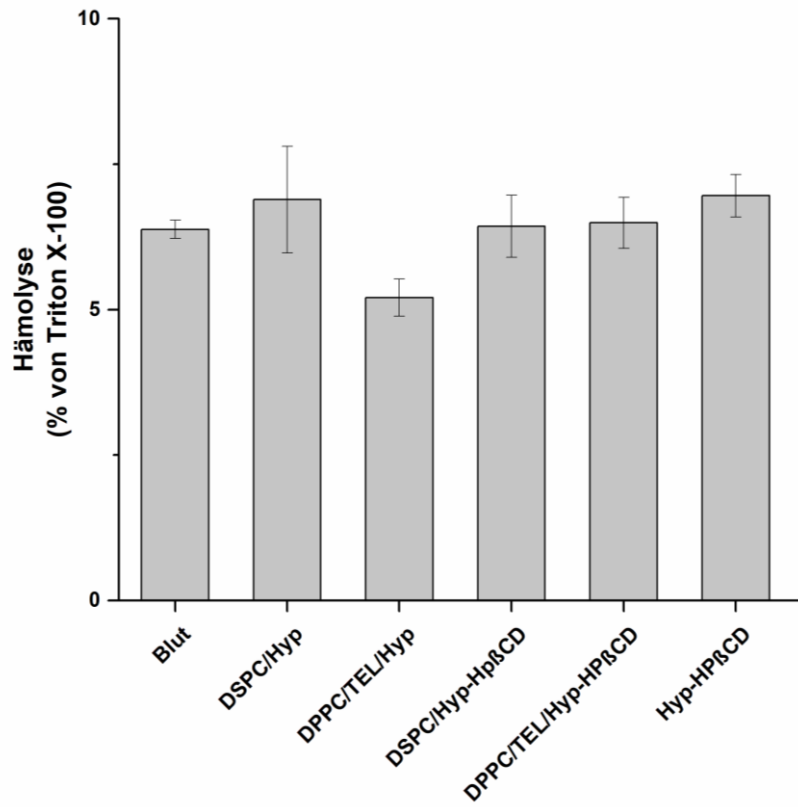


Abbildung 45: Hämolyse-Assay der verschiedenen liposomalen Formulierungen. Triton™ X-100 diente als 100% Positivkontrolle

7.4.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aPTT-Bestimmung wird diagnostisch vor allem als Suchtest für die häufigsten Gerinnungsstörungen und zur Überwachung der Heparintherapie angewendet. Mit dieser Testmethode werden die im intrinsischen System wirksamen Gerinnungsfaktoren erfasst [131]. Um die Biokompatibilität der Liposomen weiterhin zu evaluieren, wurde die Wirkung auf die intrinsische Gerinnungskaskade untersucht.

Die aPTT Zeit von Blutplasma betrug 32,8 s und liegt somit im Referenzbereich von 28-40 s (Abb. 46) [131]. Ein aPTT Wert über 70 s kann spontane Blutungen nach sich ziehen [132]. Die Zugabe der Liposomen führte zu einer Steigerung der Gerinnungszeit um 5-12 s. Dabei zeigten die DSPC/Hyp und DPPC/TEL/Hyp Liposomen moderate aPTT Zeiten von jeweils 38 und 42 s. Die Zugabe von DSPC/Hyp-HPβCD und DPPC/TEL/Hyp-HPβCD führte zu Gerinnungszeiten von jeweils 44 und 45 s. Am stärksten war der gerinnungshemmende Effekt bei freiem Hyp-HPβCD mit 48 s aPPT Zeit. Somit lag die durch liposomale Formulierungen verursachte Steigerung der Gerinnungszeit in einem akzeptablen Bereich. Der gerinnungshemmende Effekt von Hyp-HPβCD konnte durch Verkapselung in Liposomen abgeschwächt werden.

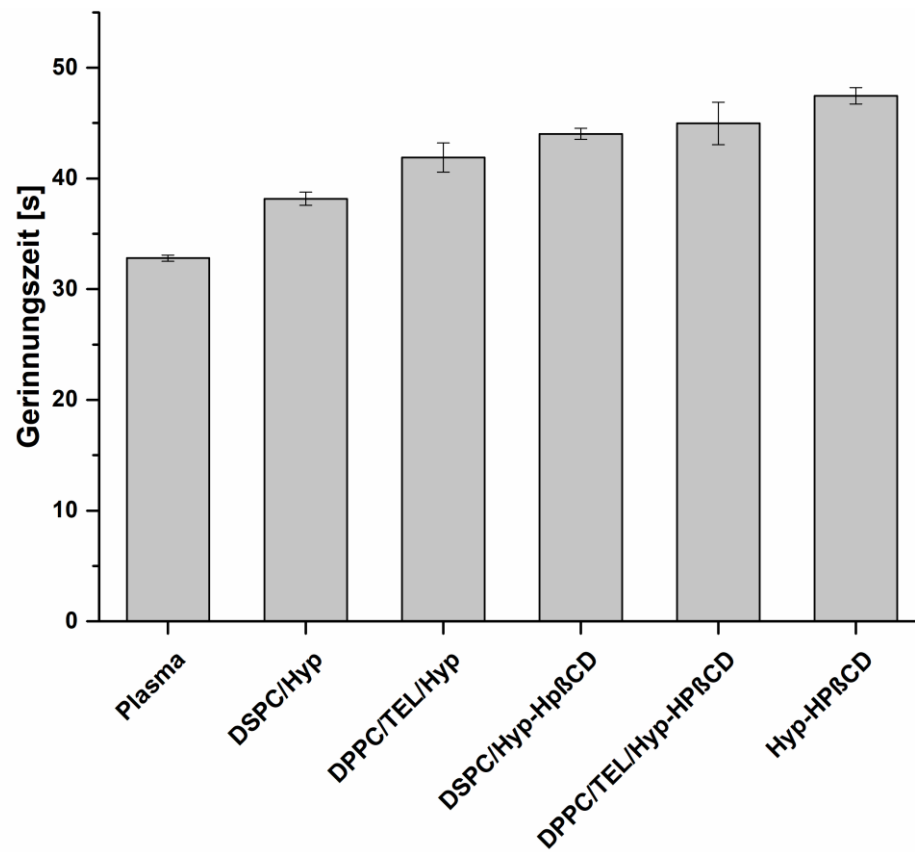


Abbildung 46: aPTT Test der verschiedenen liposomalen Formulierungen von Hypericin. Blutplasma diente als Kontrolle

8 *In vitro* Untersuchung der photodynamischen Aktivität im Chorioallantois-Membran-Modell – Ergebnisse und Diskussion

Die Hauptquelle von soliden Tumoren für Nährstoffe und Sauerstoff ist ihr eigenes Gefäßsystem, das sie nach dem Erreichen einer bestimmten Größe ausbilden [7]. Dieses stellt somit ein interessantes Target für die Tumorthherapie dar. Die Schädigung von Endothelzellen während der PDT induziert die Bildung von Thromben im Gefäßlumen, das wiederum löst eine physiologische Signalkaskade aus. Dabei nimmt die Gefäßdurchlässigkeit zu und es kommt zur Vasokonstriktion oder dem Kollaps der Gefäße und somit zum Stagnieren des Blutflusses [133]. Dieses vaskuläre Targeting ist die zweite Säule der PDT.

Für die Untersuchung von Effekten auf die Mikrogefäße während der PDT wurde das Chorioallantois-Membran-Modell (CAM-Modell) verwendet. Da die CAM eine transparente Membran ist, ist es möglich, die einzelnen Blutgefäße zu beobachten und die Aufnahme der Formulierungen sowie die Blutstase oder den Blutfluss in Echtzeit zu verfolgen. Zu Beginn des Versuchs wurde sichergestellt, dass die Bestrahlung in Kombination mit der Injektion von PBS-Puffer keinen Einfluss auf die Integrität der Mikrogefäße hatte (Abb. 47). Anschließend erfolgte die Bestrahlung nach Injektion der verschiedenen liposomalen Formulierungen mit einem Drug-Light Intervall von 7 min. Die DSPC/Hyp Liposomen verursachten eine erhebliche Zerstörung der Mikrogefäße, die in einem Behandlungslevel 3 resultierten, das einen totalen Kollaps kleiner Gefäße ($\varnothing < 30 \mu\text{m}$) und einen teilweisen Verschluss großer Gefäße bedeutet. Die DPPC/TEL/Hyp Liposomen induzierten eine Reaktion, die als Behandlungslevel 4 einzustufen ist, mit einem totalen Kollaps größerer Gefäße ($\varnothing < 70 \mu\text{m}$). Die DSPC/HYP-HP β CD Liposomen hingegen zeigten nur einen geringen Effekt und bewirkten eine leichte Abnahme der Blutflussrate und den Verschluss kleinerer Gefäße ($\varnothing < 10 \mu\text{m}$). Für die DPPC/TEL/HYP-HP β CD Liposomen konnte kein Unterschied bezogen auf den Blutfluss oder die Gefäßintegrität vor und nach Bestrahlung festgestellt werden. Der optimale Bereich für die Gefäßschädigung liegt zwischen Behandlungslevel 3 und 4, da das totale Ausschalten des Tumorgefäßsystems den sauerstoffabhängigen photodynamischen Prozess beeinträchtigen würde [134].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Hypericin aus den nach der Filmmethode produzierten Liposomen sich schnell und ausreichend in den Endothelzellen anreicherte. Ein Grund dafür könnte auch eine gewisse Hypericinfreisetzung aufgrund der Affinität zu

Plasmaproteinen sein, die im Fall von Albumin und LDL außerdem als Carrier für Hypericin dienen können. Daher zeigen die Filmmethode-Vesikel nicht nur gute Eigenschaften für das direkte Targeting von Tumorzellen, sondern auch das vaskuläre Targeting.

DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen hingegen, welche die Einschlussverbindung offensichtlich sehr stabil verkapseln, zeigten nur einen moderaten antivaskulären Effekt. Die DPPC/TEL/Hyp-HP β CD Vesikel zeigten keinen Effekt. Der Grund dafür ist vermutlich die rigidere und weniger permeable Membran der TEL-Liposomen. Dies könnte die Zirkulationszeit der Arzneistoffträger verlängern. Somit könnten die DRV-Liposomen besonders geeignet sein, Hypericin an und in den Tumor zu bringen.

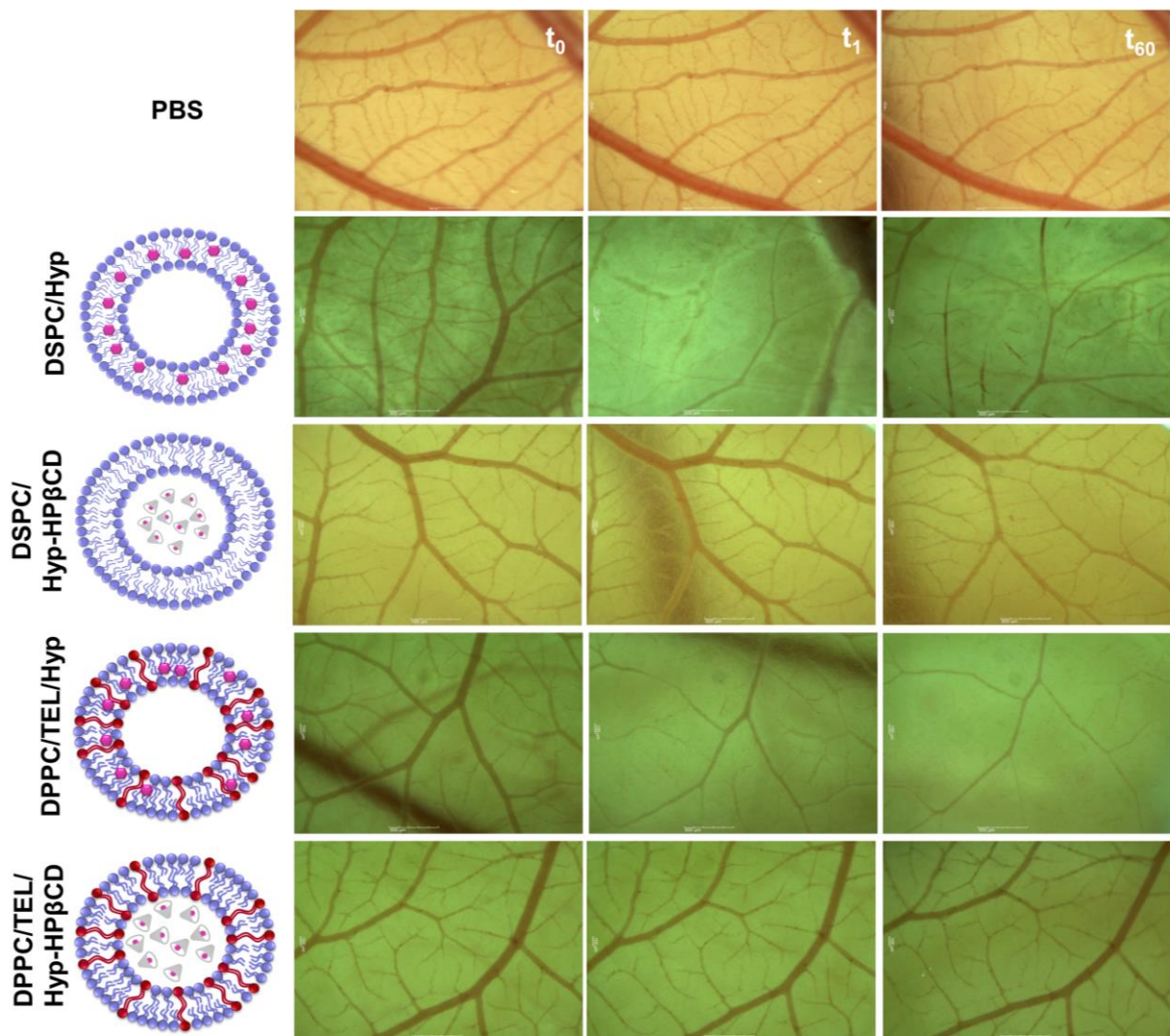


Abbildung 47: Tabellarische Darstellung der photodynamischen Effekte auf die Mikrogefäße der CAM nach intravenöser Injektion von 100 μ l Liposomen (DSPC oder DPPC/TEL (90/10 mol:mol) entweder mit Hypericin oder Hyp-HP β CD beladen) mit einer Gesamtkonzentration von 100 μ M vor Bestrahlung (t₀), kurz nach Bestrahlung (t₁) und 60 min nach Bestrahlung (t₆₀) mit einem 589 nm Diodenlaser bei einer Fluenz von 11,4 J/cm²

9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung von liposomalen Hypericinformulierungen und die Untersuchung der photodynamischen Aktivität derselben auf Bakterien und Tumorzellen dargestellt. Da Hypericin sehr lipophile Eigenschaften besitzt und in wässrigen Lösungen Aggregate bildet, ist die klinische Applikation eine große Herausforderung und verlangt nach einer stabilen wässrigen Formulierung des Photosensitisers. Zwei verschiedene Strategien zur Verkapselung von Hypericin in Liposomen sollten hierbei verglichen werden. Zum einen wurde Hypericin mit Hilfe der Filmmethode mit den hydrophoben Resten der Lipide in der Liposomenmembran assoziiert und zum anderen wurde eine Einschlussverbindung aus Hypericin und HP β CD mit Hilfe der DRV-Methode in das wässrige Kompartiment der Liposomen eingeschlossen.

Der Heranführung an das Thema in **Kapitel 1** folgt die Zusammenfassung und Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Herstellungs- und Charakterisierungsmethoden in **Kapitel 2**.

Kapitel 3 beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Liposomen. Mit Hilfe von DLS, LDA, AFM und SEC wurde der hydrodynamische Durchmesser, der PDI, das Zetapotential, die Morphologie, die Verkapselungseffizienz sowie die Stabilität während der Lagerung oder in Anwesenheit von Serum untersucht. Alle Formulierungen zeigten einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 127 und 212 nm und einen PDI zwischen 0,21 und 0,32. Das Zetapotential war im Fall der DRV-Liposomen besonders niedrig, was vermuten lässt, dass der Hypericin-Komplex auch auf der liposomalen Membran adhäriert. Die AFM-Aufnahmen zeigten kugelförmige Vesikel und somit eine für Liposomen charakteristische Morphologie. Die Einschlusseffizienz der DSPC Liposomen konnte durch die DRV-Methode deutlich gesteigert werden. Liposomen die zusätzlich TEL als Membranbestandteil enthielten verkapselten mehr Hypericin als ihre Pendants, welche nur aus DSPC bestanden. In den Studien zur Lagerstabilität konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Cyclodextrin auch nach drei Wochen Lagerung bei 4 °C keine Veränderungen von Größe, PDI oder Zetapotential verursacht. Außerdem zeigten die Formulierungen eine ausreichende Stabilität in IMDM oder 60% FKS.

In **Kapitel 4** sind die photodynamischen Wirkungen der Liposomen auf *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* und *E. coli* DH5 α dargestellt. Des Weiteren wurde die Bindung der Liposomen an die grampositiven Bakterien mit Hilfe eines Bindungsassays und CLSM-

Aufnahmen untersucht. *E. coli* DH5 α zeigte keine Sensitivität gegenüber der PACT mit Hypericin, Hyp-HP β CD oder Hypericin-Liposomen. Es war nicht möglich mit Hilfe der Liposomen die äußere Membran der gramnegativen Bakterien, welche eine starke Permeationsbarriere darstellt, zu durchdringen. Bezüglich der PACT von grampositiven Bakterien waren die DRV-Liposomen den nach der Filmmethode hergestellten Vesikeln überlegen. Den stärksten Effekt erzielten DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen mit einer bakteriellen Reduktion von 4,1 log₁₀. Der Bindungsassay unterstützte das Ergebnis der *in vitro* Versuche, indem er zeigte, dass die DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen auch am meisten PS an oder in die Bakterienmembran transportierten.

Um sich *in vivo* Versuchsbedingungen anzunähern, wurde die beste liposomale Formulierung im Hühnerembryomodelle getestet. Diese Ergebnisse sind in **Kapitel 5** zusammengefasst. Interessanterweise zeigen hier, im Gegensatz zu den *in vitro* Studien, die DSPC/Hyp-HP β CD Liposomen eine stärkere antibakterielle Wirkung als der freie Komplex. Die Liposomen bewirkten eine durchschnittliche Verringerung der Bakterienlast von 1,2 log₁₀.

Kapitel 6 befasst sich mit der photodynamischen Wirkung der Hypericinformulierungen auf Biofilmen von *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*. Außerdem wird mit Hyp-HP β CD und/oder DSPC/Hyp-HP β CD beschichtetes Kathetermaterial auf seine Antibiofilm-Wirkung untersucht. Als Bestandteil einer Oberflächenbeschichtung von PUR erzielte der Komplex eine Verringerung der Biofilmbakterien um 4,3 log₁₀. Diese Wirkung konnte unter zusätzlicher Anwendung von Ultraschall auf 6,8 log₁₀ Reduktion der Bakterienanzahl gesteigert werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass photodynamische Beschichtungen von Kathetermaterial einen guten Ansatz zur Bekämpfung von Katheter-assoziierten Infektionen darstellen können.

Kapitel 7 beschäftigt sich mit dem Einsatz der Liposomen für die antitumorale Therapie. Dabei wurden DRV-Liposomen bestehend aus DPPC/TEL oder DSPC mit Filmmethode-Vesikeln der gleichen Zusammensetzung verglichen. Die photodynamische *in vitro* Aktivität auf SK-OV-3 Zellen war für alle Formulierungen konzentrationsabhängig. Im Gegensatz zu den DRV-Liposomen zeigten die konventionellen Liposomen bei einer geringen Fluenz von 2,1 J/cm² bereits einen phototoxischen Effekt. Während der Steigerung der Fluenz bis zu 12,4 J/cm² glich sich die phototoxische Wirkung der Formulierungen an. Des Weiteren war der photodynamische Effekt der Liposomen von der Inkubationszeit abhängig. Die ideale Inkubationszeit lag bei 4 h. Der qualitative Nachweis der Liposomenaufnahme in die Zellen

erfolgte mit Hilfe der Konfokalmikroskopie. Die Liposomen scheinen dabei das Hypericin in einem jeweils ähnlichen Umfang zu den Zellen zu transportieren. Lediglich der freie Komplex zeigte eine stärkere Fluoreszenz innerhalb der Zellen. Nichtsdestotrotz ist eine Verkapselung des Komplexes sinnvoll, da das *in vivo* Schicksal desselbigen besser kontrolliert und somit mehr Hypericin zielgerichteter zum Tumorgewebe gelangen kann. Die Untersuchung der Endozytosewege lässt vermuten, dass die DRV-Liposomen hauptsächlich über die Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Die konventionellen Liposomen hingegen scheinen das Hypericin zu einem überwiegenden Teil auch über andere Pathways in die Zellen zu transportieren.

Neben der direkten Zelltoxizität ist auch der antivaskuläre Effekt der Formulierungen für die antitumorale Therapie von Interesse. Der Hämolyse-Assay und die aPTT-Zeit weisen darauf hin, dass die Formulierungen hämokompatibel und somit für die intravenöse Applikation geeignet sind. Diese erfolgte *in ovo* in das Gefäßsystem der CAM. Die Ergebnisse dieser CAM-Studien sind in **Kapitel 8** zusammengefasst. Die DRV-Liposomen zeigen hierbei einen moderaten bis keinen antivaskulären Effekt, während die konventionellen Liposomen starke Schäden an den Mikrogefäßen verursachen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die konventionellen Liposomen gut für die antivaskuläre Therapie geeignet sind, da sie Hypericin zu den Endothelzellen und ins Blut transportieren. Die DRV-Liposomen hingegen scheinen den Wirkstoff sehr stabil zu verkapseln und ihn vor Licht abzuschirmen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Art der Verkapselung geeignet ist, mehr Hypericin an den Zielort Tumor zu transportieren, indem eine frühzeitige Freisetzung des Hypericins in die Blutbahn durch die spezielle Verkapselung verhindert wird.

Zusammenfassend ist es gelungen, stabile liposomale Formulierungen von Hypericin herzustellen, die für die antibakterielle und antitumorale photodynamische Therapie geeignet sind und sowohl lokal als auch intravenös verabreicht werden können.

10 Summary

The purpose of this doctoral thesis was the development of liposomal hypericin formulations and the investigation of their photodynamic activity against bacteria and tumour cells. Since hypericin is very lipophilic and forms aggregates in aqueous solutions, clinical application is a challenge and requires the development of an aqueous hypericin formulation. For this purpose, two different strategies to encapsulate hypericin into liposomes viz. hypericin incorporated within the liposomal membrane prepared by thin-film hydration method and its cyclodextrine complex encapsulated inside the aqueous milieu of the liposome prepared by dehydration-rehydration method were compared.

Chapter 1 of the thesis introduces the reader to the background and state of art in PDT and liposomal technology. This is followed by **Chapter 2** which deals with the summary and explanation of the methods employed. **Chapter 3** involves the characterisation of the liposomes. Hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency and the stability during storage or in the presence of serum were determined with photon correlation spectroscopy (PCS), laser doppler anemometry (LDA), atomic force microscopy (AFM) and size exclusion chromatography (SEC) respectively. All formulations characterised showed a hydrodynamic diameter ranging between 127 and 212 nm and a PDI between 0.21 and 0.32. The zeta potential was especially low in case of dehydration-rehydration vesicles (DRV). This leads to the hypothesis that the Hyp-HP β CD complex also adheres on the liposomal surface. The AFM micrographs confirmed the typical morphology of liposomes showing spherically shaped vesicles. By using the DRV method the entrapment efficiency of hypericin in DSPC vesicles could be increased. Furthermore, liposomes composed of DPPC/TEL encapsulated more hypericin than their DSPC counterparts. The stability studies showed that cyclodextrine had no effect on size, PDI or zeta potential during storage and that the formulations were stable in cell culture medium or 60% FCS.

The photodynamic activity of hypericin liposomes on *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis* and *E. coli* DH5 α is summarised in **Chapter 4** of the thesis. Additionally, CLSM micrographs and binding assay served as qualitative and quantitative analysis of hypericin delivery in gram-positive bacteria. *E. coli* DH5 α was not susceptible to hypericin, Hyp-HP β CD or hypericin liposome mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). The vesicles were unable to facilitate the uptake of hypericin through the outer membrane, which

is an effective permeation barrier. Concerning the PACT of gram-positive bacteria, the DRV vesicles were more effective than conventional liposomes prepared using the thin-film hydration method. The strongest effect could be seen using DSPC/Hyp-HP β CD liposomes, which led to a bacterial reduction of 4.1 log₁₀. The binding assay supported these results, by confirming that DSPC/Hyp-HP β CD vesicles were transporting the highest amount of hypericin to the bacterial membrane.

In order to build a bridge between *in vitro* and *in vivo*, the best formulation was tested in the chick embryo model. Interestingly, the results, which are presented in **Chapter 5**, were quite opposite to the *in vitro* studies. The DSPC/Hyp-HP β CD liposomes led to a decrease of the bacterial load of 1.2 log₁₀ and thus showed a stronger antibacterial effect than the complex.

Chapter 6 evaluates the photodynamic activity of hypericin liposomes on biofilms of *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *bovis*. Additionally, Hyp-HP β CD and/or DSPC/Hyp-HP β CD modified implant material was examined in regard to its antibacterial efficacy. The surface coating containing only Hyp-HP β CD led to a reduction of 4.3 log₁₀ of biofilm bacteria. This effect could be increased to a 6.8 log₁₀ reduction by applying ultrasound. Conclusively, the results suggest that photodynamic surface modifications are an interesting approach to prevent catheter related infections.

Chapter 7 investigates the antitumor characteristics of hypericin liposomes. Therefore, DRV liposomes consisting either of DPPC/TEL or DSPC were compared to vesicles of the same composition prepared using the thin-film hydration method. The photodynamic *in vitro* activity on SK-OV-3 cells was concentration dependent in case of all formulations. At a low irradiation fluence of 2.1 J/cm², the conventional liposomes were more phototoxic than the DRV liposomes. By increasing the irradiation fluence up to 12.4 J/cm², the phototoxicity of all formulations approached a similar level. Moreover, the photodynamic activity of the liposomes was dependent on the incubation time with an ideal incubation period of 4 h. Qualitative evidence for the uptake of liposomes into SK-OV-3 could be acquired from the CLSM micrographs. Thereby, liposomal hypericin seems to be taken up to a similar extent, whereas free inclusion complex showed a more intense fluorescence. Nevertheless, encapsulation of hypericin complex into liposomes can be beneficial in case of controlling the *in vivo* fate of the complex. Endocytosis pathway studies led to the assumption that the DRV liposomes were mainly taken up by clathrin mediated endocytosis. The conventional liposomes on the contrary seem to be taken up additionally through other pathways.

Furthermore, the haemolysis assay and the aPTT time indicate that the liposomes were haemocompatible and thus suitable for intravenous injection.

The photodynamic effect of the formulations on the microvasculature of the chorioallantoic membrane (CAM) is shown in **Chapter 8**. DRV liposomes exhibited only a moderate to no antivasular effect, while the conventional liposomes caused a substantial photodestruction of the microvasculature. These results indicate that the conventional liposomes are suitable for antivasular targeting by delivering hypericin to the endothelial cells. The DRV vesicles on the contrary seem to yield the Photosensitiser from light by a very stable encapsulation. Thus we assume that these vesicles can be further developed for direct tumour targeting.

In summary it was possible to prepare stable hypericin liposomes which can be applied both locally and intravenously and are suitable for antibacterial and anti-tumour photodynamic therapy.

11 Referenzen

- 1 *Spikes JD*. Photodynamic Action: From Paramecium to Photochemotherapy. *Photochemistry and photobiology* 1997; 65: 142S-147S
- 2 *Dougherty TJ*. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *Journal of clinical laser medicine & surgery* 1996; 14: 219 – 221
- 3 *Moan J, Peng Q*. An outline of the history of PDT. In: Patrice T, Hrsg. *Photodynamic Therapy*. Cambridge, Secaucus: Royal Society of Chemistry, The; Springer [distributor]; July 2004: 1 – 18
- 4 *Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR*. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2004; 1: 279 – 293
- 5 *Wainwright M*. Photosensitisers in biomedicine. Oxford, Hoboken, N.J: John Wiley/Wiley-Blackwell; 2009
- 6 *Moor AC*. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2000; 57: 1 – 13
- 7 *Abels C*. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2004; 3: 765 – 771
- 8 *Wachowska M, Muchowicz A, Demkow U*. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Central-European Journal of Immunology* 2016; 40: 481 – 485
- 9 *Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR*. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2005; 2: 91 – 106
- 10 *Pass HI*. Photodynamic Therapy in Oncology: Mechanisms and Clinical Use. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85: 443 – 456
- 11 *Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR*. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2009; 6: 170 – 188
- 12 *Hamblin MR, Hasan T*. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2004; 3: 436 – 450
- 13 *Winkler K, Simon C, Finke M et al*. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by chlorin e6 and red light ($\lambda=670\text{nm}$). *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2016; 162: 340 – 347
- 14 *Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL et al*. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 1998; 160: 177 – 181
- 15 *Maisch T*. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2015; 14: 1518 – 1526

- 16 *Soncin M, Fabris C, Busetti A et al.* Approaches to selectivity in the Zn(ii)–phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2002; 1: 815 – 819
- 17 *Jori G, Fabris C, Soncin M et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in surgery and medicine* 2006; 38: 468 – 481
- 18 *Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR.* Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2013; 8: 108 – 120
- 19 *Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z et al.* Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and photobiology* 1992; 55: 89 – 96
- 20 *Sutherland IW.* The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology* 2001; 9: 222 – 227
- 21 *Melo WC de, Avci P, Oliveira MN de et al.* Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert review of anti-infective therapy* 2013; 11: 669 – 693
- 22 *Wainwright M, Maisch T, Nonell S et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *The Lancet Infectious Diseases* 2017; 17: e49-e55
- 23 *Hashmi JT, Hamblin MR.* Chapter 16. Photodynamic Therapy for *Helicobacter pylori* Infections. In: Hamblin MR, Jori G, Hrsg. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2011: 389 – 401
- 24 *Chang J-E, Oak C-H, Sung N et al.* The potential application of photodynamic therapy in drug-resistant tuberculosis. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2015; 150: 60 – 65
- 25 *Apolikhina IA, Sukhih GT, Teterina TA et al.* Antiviral and antimycotic effects of PDT with ALAsense. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2011; 8: 170 – 171
- 26 *Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K et al.* Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2007; 6: 1067 – 1075
- 27 *Sarris J.* Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. *Phytotherapy research : PTR* 2018; 32: 1147 – 1162
- 28 *Wölfl U, Seelinger G, Schempp CM.* Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta medica* 2014; 80: 109 – 120
- 29 *Durán N, Song P-S.* HYPERICIN AND ITS PHOTODYNAMIC ACTION. *Photochemistry and photobiology* 1986; 43: 677 – 680
- 30 *Schulz H-U, Schürer M, Bässler D et al.* Investigation of the effect on photosensitivity following multiple oral dosing of two different hypericum extracts in healthy men. *Arzneimittel-Forschung* 2006; 56: 212 – 221
- 31 *Brockmann H, Haschad MN, Maier K et al.* ber das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* 1939; 27: 550
- 32 *Brockmann H, Pohl F, Maier K et al.* Über das Hypericin, den photodynamischen Farbstoff des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*). *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1942; 553: 1 – 52

- 33 Kubin A, Wierrani F, Burner U et al. Hypericin--the facts about a controversial agent. *Current pharmaceutical design* 2005; 11: 233 – 253
- 34 Theodossiou TA, Hothersall JS, Witte PA de et al. The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. *Molecular pharmaceutics* 2009; 6: 1775 – 1789
- 35 Blank M, Kostenich G, Lavie G et al. Wavelength-dependent properties of photodynamic therapy using hypericin in vitro and in an animal model. *Photochemistry and photobiology* 2002; 76: 335 – 340
- 36 LM Davids KM. The Anticancer Activity of Hypericin in Photodynamic Therapy. *JBABM* 2012; s6
- 37 Jiang B, Wang J, Ni Y et al. Necrosis avidity: a newly discovered feature of hypericin and its preclinical applications in necrosis imaging. *Theranostics* 2013; 3: 667 – 676
- 38 Olivo M, Fu CY, Raghavan V et al. New frontier in hypericin-mediated diagnosis of cancer with current optical technologies. *Annals of biomedical engineering* 2012; 40: 460 – 473
- 39 DIWU Z, WILLIAMLOWN J. Photosensitization with anticancer agents 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: Formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radical Biology and Medicine* 1993; 14: 209 – 215
- 40 Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B et al. Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in plant science* 2016; 7: 560
- 41 Saw CLL, Olivo M, Soo KC et al. Delivery of hypericin for photodynamic applications. *Cancer letters* 2006; 241: 23 – 30
- 42 Kessel D, Luo Y, Deng Y et al. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology* 1997; 65: 422 – 426
- 43 Siboni G, Weitman H, Freeman D et al. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2002; 1: 483 – 491
- 44 Kamuhabwa AR, Agostinis PM, D'Hallewin M-A et al. Cellular Photodestruction Induced by Hypericin in AY-27 Rat Bladder Carcinoma Cells. *Cancer letters* 2001; 74: 126
- 45 Chen B, Zupkó I, Witte PA de. Photodynamic therapy with hypericin in a mouse P388 tumor model: vascular effects determine the efficacy. *International journal of oncology* 2001; 18: 737 – 742
- 46 Cavarga I, Brezáni P, Fedorocko P et al. Photoinduced antitumour effect of hypericin can be enhanced by fractionated dosing. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2005; 12: 680 – 683
- 47 Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2012; 61: 215 – 221
- 48 Garg AD, Agostinis P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2014; 13: 474 – 487
- 49 Yow CMN, Tang HM, Chu ESM et al. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochemistry and photobiology* 2012; 88: 626 – 632

- 50 Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2010; 9: 365 – 369
- 51 Montanha MC, Silva LL, Pangoni FBB et al. Response surface method optimization of a novel Hypericin formulation in P123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2017; 170: 247 – 255
- 52 Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T et al. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *BioMed research international* 2013; 2013: 840417
- 53 Melo WCMA de, Lee AN, Perussi JR et al. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2013; 10: 647 – 650
- 54 García I, Ballesta S, Gilaberte Y et al. Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future microbiology* 2015; 10: 347 – 356
- 55 Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* 1964; 8: 660-IN10
- 56 Deamer DW. From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; 24: 1308 – 1310
- 57 D. D. Lasic. *Liposomes from Physics to Applications*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1993
- 58 Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 1971; 14: 95 – 99
- 59 Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 2006; 1: 297 – 315
- 60 Sercombe L, Veerati T, Moheimani F et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* 2015; 6
- 61 Derycke ASL, Witte PAM de. Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced drug delivery reviews* 2004; 56: 17 – 30
- 62 Jin CS, Zheng G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers in surgery and medicine* 2011; 43: 734 – 748
- 63 Ferro S, Ricchelli F, Mancini G et al. Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2006; 83: 98 – 104
- 64 Ferro S, Ricchelli F, Monti D et al. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007; 39: 1026 – 1034
- 65 Yang K, Gitter B, Rüger R et al. Antimicrobial peptide-modified liposomes for bacteria targeted delivery of temoporfin in photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2011; 10: 1593 – 1601
- 66 Paliwal SR, Paliwal R, Vyas SP. A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Drug delivery* 2015; 22: 231 – 242

- 67 *Nicolosi D, Scalia M, Nicolosi VM et al.* Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents* 2010; 35: 553 – 558
- 68 *Tiwari G, Tiwari R, Rai AK.* Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2010; 2: 72 – 79
- 69 *Loftsson T, Brewster ME.* Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences* 1996; 85: 1017 – 1025
- 70 *McCormack B, Gregoriadis G.* Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 162: 59 – 69
- 71 *Brock TD, Brock KM, Belly RT et al.* *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv fur Mikrobiologie* 1972; 84: 54 – 68
- 72 *Jacquemet A, Barbeau J, Lemiègre L et al.* Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie* 2009; 91: 711 – 717
- 73 *Ulrich NP, Gmajner D, Raspor P.* Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied microbiology and biotechnology* 2009; 84: 249 – 260
- 74 *Mahmoud G, Jedelská J, Strehlow B et al.* Bipolar tetraether lipids derived from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* for membrane stabilization of chlorin e6 based liposomes for photodynamic therapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2015; 95: 88 – 98
- 75 *Derycke ASL, Witte PAM de.* Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. *International journal of oncology* 2002; 20: 181 – 187
- 76 *Galanou MC, Theodossiou TA, Tsiourvas D et al.* Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition. *Photochemistry and photobiology* 2008; 84: 1073 – 1083
- 77 *Fadel M, Kassab K, Youssef T.* Photodynamic efficacy of hypericin targeted by two delivery techniques to hepatocellular carcinoma cells. *Lasers in medical science* 2010; 25: 675 – 683
- 78 *Konrad Engelhardt.* Herstellung und Charakterisierung tetraetherlipidhaltiger Lipoplexe und Lipopolyplexe als neuartige Vehikel für die orale Gentherapie [Dissertation]. Marburg: Philipps Universität Marburg; 2017
- 79 *McCormack B, Gregoriadis G.* Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 112: 249 – 258
- 80 *Marxer EEJ, Brüssler J, Becker A et al.* Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2011; 77: 430 – 437
- 81 *Antimisiaris SG.* Preparation of DRV liposomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2010; 605: 51 – 75
- 82 *Vögeling H, Duse L, Seitz BS et al.* Multilayer Bacteriostatic Coating for Surface Modified Titanium Implants. *Phys. Status Solidi A* 2018; 215: 1700844
- 83 *Huang L, Dai T, Hamblin MR.* Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2010; 635: 155 – 173

- 84 *Zhang J, Gauger PC.* Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2014; 1161: 265 – 276
- 85 *Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* 2000; 40: 175 – 179
- 86 *El-Gewely MR, Hrsg.* Biotechnology annual review. Amsterdam: Elsevier; 2005
- 87 *Özçetin A, Aigner A, Bakowsky U.* A chorioallantoic membrane model for the determination of anti-angiogenic effects of imatinib. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2013; 85: 711 – 715
- 88 *Pegaz B, Debefve E, Ballini JP et al.* Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28: 134 – 140
- 89 *Drummond DC, Meyer O, Hong K et al.* Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 691 – 744
- 90 *Nagayasu, Uchiyama, Kiwada.* The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced drug delivery reviews* 1999; 40: 75 – 87
- 91 *Rukavina Z, Vanić Ž.* Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics* 2016; 8
- 92 *Li L, Hagen TLM ten, Schipper D et al.* Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2010; 143: 274 – 279
- 93 *Perrotta R, Prieto M, Alonso S et al.* DSPC Liposomes Improve Transport of L-cysteine and Reduce Metabolic Activity. *BBJ* 2016; 12: 1 – 11
- 94 *Yang T, Cui F-D, Choi M-K et al.* Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 338: 317 – 326
- 95 *Vanić Z, Barnert S, Süß R et al.* Fusogenic activity of PEGylated pH-sensitive liposomes. *Journal of liposome research* 2012; 22: 148 – 157
- 96 *Waldmann S, Almukainzi M, Bou-Chacra NA et al.* Provisional biopharmaceutical classification of some common herbs used in Western medicine. *Molecular pharmaceutics* 2012; 9: 815 – 822
- 97 *Joniova J, Rebič M, Strejčková A et al.* Formation of Large Hypericin Aggregates in Giant Unilamellar Vesicles- Experiments and Modeling. *Biophysical Journal* 2017; 112: 966 – 975
- 98 *Uhl P, Pantze S, Storck P et al.* Oral delivery of vancomycin by tetraether lipid liposomes. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2017; 108: 111 – 118
- 99 *Hatzi P, Mourtas S, Klepetsanis PG et al.* Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: effect of liposome type and lipid composition. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 333: 167 – 176
- 100 *Bigdeli A, Palchetti S, Pozzi D et al.* Exploring Cellular Interactions of Liposomes Using Protein Corona Fingerprints and Physicochemical Properties. *ACS nano* 2016; 10: 3723 – 3737

- 101 *Caracciolo G.* Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2015; 11: 543 – 557
- 102 *van Nguyen H, Lee B-J.* Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *International Journal of Nanomedicine* 2017; 12: 3137 – 3151
- 103 *Caracciolo G, Pozzi D, Capriotti AL et al.* Lipid composition: a “key factor” for the rational manipulation of the liposome–protein corona by liposome design. *RSC Adv.* 2015; 5: 5967 – 5975
- 104 *Kubin A, Wierrani F, Jindra RH et al.* Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs under experimental and clinical research* 1999; 25: 13 – 21
- 105 *Kashef N, Borghei YS, Djavid GE.* Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2013; 10: 150 – 155
- 106 *Tsai T, Yang Y-T, Wang T-H et al.* Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers in surgery and medicine* 2009; 41: 316 – 322
- 107 *Yang K, Gitter B, Rüger R et al.* Wheat germ agglutinin modified liposomes for the photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemistry and photobiology* 2012; 88: 548 – 556
- 108 *Kashef N, Karami S, Djavid GE.* Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2015; 12: 186 – 192
- 109 *Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A.* Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 387: 187 – 198
- 110 *Hager B, Strauss WSL, Falk H.* Cationic hypericin derivatives as novel agents with photobactericidal activity: synthesis and photodynamic inactivation of *Propionibacterium acnes*. *Photochemistry and photobiology* 2009; 85: 1201 – 1206
- 111 *Jankowski A, Jankowski S, Mirończyk A et al.* The action of photosensitizers and serum in a bactericidal process. II. The effects of dyes: hypericin, eosin Y and safranin O. *Polish journal of microbiology* 2005; 54: 323 – 330
- 112 *Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K et al.* Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* 2015; 15
- 113 *Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N et al.* The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 2007; 59: 1162 – 1176
- 114 *Ghoke SS, Sood R, Kumar N et al.* Evaluation of antiviral activity of *Ocimum sanctum* and *Acacia arabica* leaves extracts against H9N2 virus using embryonated chicken egg model. *BMC complementary and alternative medicine* 2018; 18: 174
- 115 *Da Silva M, Labas V, Nys Y et al.* Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poultry science* 2017; 96: 2931 – 2941
- 116 *Fux CA, Costerton JW, Stewart PS et al.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology* 2005; 13: 34 – 40
- 117 *Akoh JA.* Vascular access infections: epidemiology, diagnosis, and management. *Current infectious disease reports* 2011; 13: 324 – 332

- 118 *Carmen JC, Nelson JL, Beckstead BL et al.* Ultrasonic-Enhanced Gentamicin Transport through Colony Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2004; 10: 193 – 199
- 119 *Al Meslmani BM, Mahmoud GF, Sommer FO et al.* Multifunctional network-structured film coating for woven and knitted polyethylene terephthalate against cardiovascular graft-associated infections. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 485: 270 – 276
- 120 *Al Meslmani BM, Mahmoud GF, Leichtweiß T et al.* Covalent immobilization of lysozyme onto woven and knitted crimped polyethylene terephthalate grafts to minimize the adhesion of broad spectrum pathogens. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 2016; 58: 78 – 87
- 121 *Dayyoub E, Frant M, Pinnapireddy SR et al.* Antibacterial and anti-encrustation biodegradable polymer coating for urinary catheter. *International Journal of Pharmaceutics* 2017; 531: 205 – 214
- 122 *Mühleisen L, Alev M, Unterweger H et al.* Analysis of Hypericin-Mediated Effects and Implications for Targeted Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18
- 123 *Ioel G, Luca M de, Garofalo A et al.* Photosensitive drugs: a review on their photoprotection by liposomes and cyclodextrins. *Drug delivery* 2017; 24: 33 – 44
- 124 *Pitha J, Gerloczy A, Olivi A.* Parenteral Hydroxypropyl Cyclodextrins: Intravenous and Intracerebral Administration of Lipophiles. *Journal of pharmaceutical sciences* 1994; 83: 833 – 837
- 125 *Torchilin VP.* Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery* 2005; 4: 145 – 160
- 126 *Schifter C.* Untersuchungen zum Einfluss der Größe von Liposomen auf deren Endozytose in verschiedenen Zelllinien
- 127 *Ho Y-F, Wu M-H, Cheng B-H et al.* Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1788: 1287 – 1295
- 128 *Krzyzaniak JF, Alvarez Núñez FA, Raymond DM et al.* Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *Journal of pharmaceutical sciences* 1997; 86: 1215 – 1217
- 129 *Amin K, Dannenfelser R-M.* In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of pharmaceutical sciences* 2006; 95: 1173 – 1176
- 130 *DEIBLER GE, HOLMES MS, CAMPBELL PL et al.* Use of triton X-100 as a hemolytic agent in the spectrophotometric measurement of blood O₂ saturation. *Journal of applied physiology* 1959; 14: 133 – 136
- 131 *Mahlberg R, Gilles A, Läuml, sch A.* Hämatologie. Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. 2. Aufl. Hoboken: John Wiley & Sons; 2012
- 132 *Shashank Reddy Pinnapireddy.* Composite nanocarriers for nucleic acid delivery [Dissertation]. Marburg: Philipps Universität Marburg; 2017
- 133 *Fingar VH.* Vascular effects of photodynamic therapy. *Journal of clinical laser medicine & surgery* 1996; 14: 323 – 328
- 134 *Mahmoud G, Jedelská J, Omar SM et al.* Stabilized tetraether lipids based particles guided porphyrins photodynamic therapy. *Drug delivery* 2018; 25: 1526 – 1536

12 Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

ALA-PPIX	Aminolävulinsäure induziertes Protoporphyrin IX
AFM	Atomic Force Microscopy
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
EDD	Embryo Development Day
EPR	Enhanced Permeability and Retention
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
CAM	Chorioallantois Membran
CD	Cyclodextrin
CFU	Colony forming units (koloniebildende Einheiten (KBE))
CHCl ₃	Chloroform
CHEMS	Cholesterolhemisuccinat
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulphoxid
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-(polyethylenglycol)-2000]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
GDGT	Glycerol-Di-Glycerol-Tetraether
GDNT	Glycerol-Di-Alkyl-Nonitol- Tetraether
HPβCD	(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin

HPD	Hämatoporphyrin-Derivat
HeNe	Helium Neon
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	immunogenic cell death
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
LDA	Laser-Doppler-Anemometrie
LDL	Low Density Lipoprotein
LED	Light Emitting Diode
LUV	large unilamellar vesicle
IL	Interleukin
MeOH	Methanol
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MLV	multilamellare Vesikel
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OD	Optische Dichte
PACT	antimikrobielle photodynamische Chemotherapie
PBS-Puffer	Phosphatpuffer pH 7,4 mit einer Konzentration von 0,15 mol/l
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	Polyethylenglycol
PLFE	Polare Lipidfraktion E
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PMBN	Polymyxin B Nonapeptid
PS	Photosensitiser
PUR	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RES	retikuloendotheliales System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SK-OV-3	humane Ovarialkarzinomzellen

SUV	small unilamellar vesicle
T _c	Phasenübergangstemperatur
TEL	Tetraetherlipide
US	Ultraschall

12.2 Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Bezugsquelle
12-Well-Platten; Nunclon Delta	Nunc GmbH & Co. KG., Wiesbaden, Deutschland
96-Well-Platten	Brand GmbH + Co. KG., Wertheim, Deutschland
ø 15 mm Deckgläschen	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG., Braunschweig, Deutschland
Aceton	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Analysenwaage, Sartorius Secure	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav, Tuttnauer 3850 ELC	Tuttnauer GmbH, Linden, Deutschland
Biomassen von <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Surface & Interface Technologies, Rosenhof GmbH“, Heiligenstadt, Deutschland
Brutschrank	Heraeus GmbH & Co. KG., Hanau, Deutschland
CHEMS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chitosan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chlorpromazin	Alfa Aesar GmbH & Co. KG., Karlsruhe, Deutschland
Confocal laser scanning microscope; LSM 510/Axiovert 100M	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
CO2 Inkubator, HeraCell	Heraeus GmbH & Co. KG., Hanau, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DOPE	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
DOTAP	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
DPPC	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
DSPC	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
EggPunch	Schuett-Biotec, Deutschland
Einmalpipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette 10-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Pipette 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> DH5α	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Extraktionshülsen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum, FKS Gibco	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Filipin III	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Formaldehyd	Alfa Aesar GmbH & Co. KG., Karlsruhe, Deutschland
Gatan Alto 2500 Sputter Coater	Pleasanton, California, USA
Gefriertrockner Alpha 1-4 LSC	Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Glasrundkolben 5/10/500 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hatching incubator; Ehret KMB 6	Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland
HPβCD	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
IMDM, Zellkulturmedium	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Inkubationsschüttler, IKA KS 4000	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Kieselgel	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laminar Flow Hood; Labgard Class II	NuAire Inc., Plymouth, USA
LED Leuchte	Lumundus GmbH, Eisenach, Deutschland
LIVE/DEAD BacLight Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer, IKA®RH basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Malvern Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, Worcester, England
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mounting medium; FluorSave™	Calbiochem Corporation, San Diego, USA
MTT-Reagenz(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Müller-Hinton-Bouillon (MHB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Müller-Hinton Agarplatten	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Multikanal Pipette Pipet-Lite Multi Pipette	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG., Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rasterelektronenmikroskops JEOL JSM 7500F	Sollentuna, Schweden
Rasterkraftmikroskop Nanowizard 1	JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland
Rotationsverdampfer Heidolph Laboroto 4001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sephadex G-25 PD10 Columns	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Silicium Cantilever HQ:NSC16/AL BS	Mikromasch, Tallin, Estland

Silikonöl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silikonwafer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SK-OV-3 Zelllinie	ATCC®, Manassas, USA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> DSM 18669	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Stemi 2000-C Stereo Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Soxhlet Aufsatz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PLGA	Evonik, Darmstadt, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin -EDTA für Zellkultur	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultraschallstab Bandelin Sonoplus GM 3100	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV Mini 1240	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Weber Endolaser	Weber Medical GmbH, Lauenförde, Deutschland
Weber Lichtleiter	Weber Medical GmbH, Lauenförde, Deutschland

12.3 Publikationsliste

Publikationen

- **Nikola Plenagl**, Lili Duse, Benjamin Sebastian Seitz, Nathalie Goergen, Shashank Reddy Pinapireddy, Jarmila Jedelska, Jana Brüßler and Udo Bakowsky. (2018) Anti-cellular and anti-vascular tumor targeting with hypericin tetraether liposome mediated photodynamic therapy. *Drug Delivery* (accepted)
- **Plenagl, N.**, Seitz, B. S., Reddy Pinnapireddy, S., Jedelská, J., Brüßler, J. & Bakowsky, U. (2018). Hypericin Loaded Liposomes for Anti-Microbial Photodynamic Therapy of Gram-Positive Bacteria. *physica status solidi (a)*.
- Vögeling, H., Duse, L., Seitz, B. S., **Plenagl, N.**, Wojcik, M., Pinnapireddy, S. R. & Bakowsky, U. (2018). Multilayer Bacteriostatic Coating for Surface Modified Titanium Implants. *physica status solidi (a)*.
- Seitz, B. S., **Plenagl, N.**, Raschpichler, M., Vögeling, H., Wojcik, M., Pinnapireddy, S. R. & Bakowsky, U. Nanoparticles and Liposomes for the Surface Modification of Implants: A Comparative Study of Spraying and Dipping Techniques. *physica status solidi (a)*.
- **Nikola Plenagl**, Benjamin Sebastian Seitz, Shashank Reddy Pinapireddy, Jarmila Jedelska, Jana Brüßler and Udo Bakowsky (2018). Hypericin inclusion complexes encapsulated in liposomes for antimicrobial photodynamic therapy. (submitted)
- Hendrik Vögeling[§], **Nikola Plenagl**[§], Benjamin Sebastian Seitz, Shashank Reddy Pinapireddy, Eyas Dayyoub, Jarmila Jedelska, Jana Brüßler and Udo Bakowsky (2018). Synergistic effects of ultrasound and photodynamic therapy leading to biofilm eradication on polyurethane catheter surfaces modified with hypericin nanoformulations. *Materials Science and Engineering C* (submitted)

§ gleichermaßen am Manuskript beteiligt

Vorträge

- **N. Plenagl**, B. S. Seitz, L. Duse, N. Goergen, S. R. Pinnapireddy, J. Brüßler, J. Jedelská, U. Bakowsky
Hypericin loaded tetraether liposomes for photodynamic therapy of ovarian cancer cells
GPEN 2018, National University of Singapore, Sept 26-29, 2018
- **Nikola Plenagl**, Shashank R. Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky
Preparation and in vitro characterization of hypericin loaded liposomes for photodynamic therapy
25th Mountain-Sea-Workshop on Liposomes, Oberjoch, März 6-10, 2017
- **Nikola Plenagl**, Benjamin Sebastian Seitz, Shashank Reddy Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky
Hypericin liposomes for antimicrobial photodynamic therapy of gram-positive bacteria
ENFI-Marburg, August 28-29, 2017

Posterpräsentation

- **Nikola Plenagl**, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky
Liposomal formulations of hypericin for antibacterial photodynamic therapy
CRS-Saarbrücken, März 7-8, 2016
- **Nikola Plenagl**, Benjamin Sebastian Seitz, Shashank Reddy Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky
Liposomal formulations of hypericin for photodynamic therapy
CRS-Marburg, März 2-3, 2017
- **Nikola Plenagl**, Peer Quendt, Udo Bakowsky
Photodynamische Therapie – Licht & Leben
BioWi Weimar, September 12-14, 2017

- **Nikola Plenagl**, Benjamin Sebastian Seitz, Shashank Reddy Pinnapireddy, Jarmila Jedelská, Jana Brüßler, Udo Bakowsky
Liposomal hypericin inclusion complex for antibacterial photodynamic therapy
CRS-Halle, März 1-2, 2018
- Jennifer Lehmann, Michael R. Agel, Lili Duse, **Nikola Plenagl**, Jarmila Jedelská, and Udo Bakowsky
Enhancing the therapeutic potential of herbal antioxidants by means of liposomal encapsulation
CRS-Halle, März 1-2, 2018

12.4 Danksagung

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky für die Möglichkeit an diesem interessanten und spannenden Thema zu arbeiten und für die wissenschaftliche Unterstützung sowie zielführenden Diskussionen während der gesamten Bearbeitungsphase.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Runkel für die Erstellung des Zweitgutachtens und die Prüfung der Dissertation bedanken.

Ich danke Frau Prof. Dr. Maike Petersen für die Leitung der Prüfungskommission und die Prüfung der Dissertation als Nebenfachprüfer.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Krasel für die Prüfung der Dissertation als Nebenfachprüfer.

Frau Dr. Jana Brüßler und Frau Dr. Jarmila Jedelská danke ich für die Betreuung, fachlichen Gespräche und Ratschläge auf dem Weg zur fertigen Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Benjamin Sebastian Seitz für die Aufnahme der AFM-Bilder bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Shashank Reddy Pinnapireddy für die CLSM-Aufnahmen und die fachliche Unterstützung danken.

Frau Nathalie Goergen möchte ich für die Unterstützung und die Arbeit am Hühnerembryomodelle danken.

Frau Eva Mohr und Lili Duse danke ich für die Einführung in die Zellkultur und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Außerdem danke ich Frau Lili Duse für die Einführung in die bestehenden SOPs. Des Weiteren danke ich Frau Lili Duse und Frau Jennifer Lehmann für die vielen motivierenden Gespräche.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen und Ehemaligen, Michael Agel, Mohamad Alawak, Elias Baghdan, Jürgen Bürding, Henriette Dietrich, Lili Duse, Dr. Konrad Engelhardt, Nathalie Goergen, Sascha Hubing, Dr. Jarmila Jedelská, Jennifer Lehmann, Walaa Lufti, Susanne Lüttebrand, Dr. Gihan Mahmoud, Julia Michaelis, Eva Mohr, Dr. Shashank Reddy Pinnapireddy, Eduard Preis, Michael Raschpichler, Dr. Jens Schäfer, Dr. Eric Sasko (& Heidi), Benjamin Sebastian Seitz, Boris Strehlow, Hendrik Vögeling (& Cerberus) und Dr. Matthias Wojcik des Arbeitskreises Bakowsky sowie Frau Prof. Dr. Cornelia Keck und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für die Hilfe, Anregungen, Gespräche und nicht zuletzt das gute Arbeitsklima und die erlebte Zeit zusammen.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch Björn Schubert, meiner Schwester und meinen Eltern für ihre Unterstützung und Geduld während der letzten Jahre danken.

12.5 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Liposomale Formulierungen von Hypericin zur Anwendung in der photodynamischen Therapie“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Kirchhain, den 05.12.2018

Nikola Plenagl